



Joana Margarida Lopes da Silva Cristóvão

Licenciatura em Bioquímica

**A agregação proteica em processos
neurodegenerativos:
Mecanismos de agregação da SOD1 no
contexto da Esclerose Lateral
Amiotrófica**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Doutor Cláudio M. Gomes, ITQB-UNL
Co-orientadora: Doutora Sónia S. Leal, ITQB-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Rui Manuel Freitas Oliveira
Arguente: Prof. Doutor Carlos Miguel Ribeiro da Silva Farinha
Vogal: Prof. Doutor Cláudio Emanuel Moreira Gomes



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2012



A agregação proteica em processos neurodegenerativos: Mecanismos de agregação da SOD1 no contexto da Esclerose Lateral Amiotrófica
Joana Cristóvão



Joana Margarida Lopes da Silva Cristóvão

Licenciatura em Bioquímica

**A agregação proteica em processos
neurodegenerativos:
Mecanismos de agregação da SOD1 no
contexto da Esclerose Lateral
Amiotrófica**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Doutor Cláudio M. Gomes, ITQB-UNL
Co-orientadora: Doutora Sónia S. Leal, ITQB-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Rui Manuel Freitas Oliveira
Arguente: Prof. Doutor Carlos Miguel Ribeiro da Silva Farinha
Vogal: Prof. Doutor Cláudio Emanuel Moreira Gomes



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2012

Copyright Joana Margarida Lopes da Silva Cristóvão, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar o meu agradecimento e gratidão a todos os que me ajudaram e me apoiaram durante a realização deste trabalho:

Em primeiro lugar, ao meu orientador, Doutor Cláudio Gomes, pela oportunidade de aprendizagem, crescimento científico e evolução pessoal. Agradeço-lhe por incutir o sentido crítico, persistência e perfeccionismo. Mas principalmente pela motivação demonstrada durante todo o trabalho.

À Doutora Sónia Leal, co-orientadora, por permitir que o percurso fosse desafiante, pelo empenho, paciência e disponibilidade demonstrados durante todo o projeto.

À Tânia Lucas, Sofia Carvalho, Bárbara Henriques, João Rodrigues e Hugo Botelho, colegas e amigos do grupo "*Protein Biochemistry, Folding and Stability*", pelas alegrias e brincadeiras partilhadas dentro daquelas quatro paredes. Pelo companheirismo e por todos os comentários e sugestões que me ajudaram nos quebra-cabeças.

Aos meus pais e restante família pelo apoio e compreensão que demonstraram durante todo o ano.

Aos meus amigos pela paciência, pelas horas de descontração e por toda a amizade que sempre demonstraram.

E por fim, ao Nuno por todas as horas de espera, pela paciência, por me escutar, por todos os conselhos, pela motivação e pelo apoio incondicional.

RESUMO

A formação de agregados proteicos e amilóides são características de muitas doenças neurodegenerativas mas permanecem desconhecidos os mecanismos deste fenómeno. Neste trabalho estudou-se a superóxido dismutase 1 (SOD1), presente em depósitos proteicos na Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), como modelo. A SOD1 é uma metaloproteína homodimérica, com um centro Cu/Zn por monómero.

O estudo desenrolou-se em três vertentes: análise do efeito de modificações pós-traducionais na estabilidade e estrutura da SOD1; estudo da cinética de agregação e amiloidogénese; e determinação do efeito de pequenas moléculas com relevância fisiológica como moduladores da estabilidade e agregação. Foram expressas e purificadas três formas da SOD1 humana (dímero, dSOD1; uma variante mutada da qual resulta SOD1 monomérica, mSOD1, que se julga modular a agregação; e uma variante da forma monomérica com uma mutação patológica, mSOD1-G37R) que foram objeto de caracterização bioquímica e estrutural recorrendo a metodologias biofísicas (dicroísmo circular, emissão de fluorescência, varrimento diferencial de fluorescência).

Os resultados mostraram que as formas mSOD1 e a mSOD1-G37R são menos estruturadas relativamente à forma dimérica. Os perfis de desnaturação com ureia revelam desestabilização da forma monomérica em relação à dimérica ($\Delta C_m = 3.3$ M), e a forma mSOD1-G37R ($\Delta C_m = 1.9$ M). Verificou-se que a adição de Zn(II) é destabilizadora, mas que presença de Cu(II) não influencia a conformação proteica. O estudo da cinética de agregação a pH 7 mostrou que redução da ligação dissulfídica intramolecular aumenta a propensão de agregação, e a seguinte propensão relativa: mSOD1_{wt} \approx mSOD1-G37R > dSOD1. Verificou-se que a forma mSOD1 potencia também a agregação da forma dimérica, sugerindo assim uma toxicidade acrescida da forma monomérica no processo de agregação. A análise do efeito de 15 pequenas moléculas alteradas em doentes com ELA, a concentrações fisiológicas, revelou um efeito destabilizador sobre a forma mSOD1 e, inibição da agregação (ex: arginina, ftalato, lisina) da forma dSOD1.

Palavras-chave: Esclerose Lateral Amiotrófica, Superóxido Dismutase 1, *Folding* e agregação proteica, lões metálicos

SUMMARY

The formation of protein aggregates and amyloids are characteristic of many neurodegenerative diseases, but the mechanism of formation of these aggregates remains unknown. In this study superoxide dismutase 1 (SOD1), present in proteinaceous inclusions related to Lateral Sclerosis Amyotrophic (ALS), was studied and used as a model. SOD1 is a metalloprotein homodimeric with Cu/Zn-site in each monomer.

This study was divided into three sections: i) analysis of the effects of pos-translacional modifications in the stability and structure of SOD1; ii) kinetics studies of aggregation and amyloidogenesis; and iii) determination of the effect of small molecules with physiological relevance as modulators of stability and aggregation. Three forms of human SOD1 were expressed and purified (dimer, dSOD1; a mutated variant resulting in a monomeric SOD1 form, mSOD1, which is proposed to modulate aggregation; and a monomeric variant with a pathological mutation, mSOD1-G37R) that were subject to biochemical and structural characterization using biophysical methodologies (circular dichroism, fluorescence, differential scanning fluorescence).

The results demonstrated that mSOD1 and mSOD1-G37R are less structured than the dimeric form. The denaturation profiles with urea reveal destabilization of the monomeric form in relation to the dimeric form ($\Delta C_m = 2.5$ M) and the same occurs to mSOD1-G37R ($\Delta C_m = 4.4$ M)). It was observed that Zn(II) addition is destabilizing, but that the presence of Cu(II) does not influence the protein conformation. The kinetic study of aggregation at pH 7 demonstrated that reduction of intramolecular disulfide bridge increases the propensity of aggregation and the following relative aggregation: mSOD1_{wt} \approx mSOD1-G37R > dSOD1. It was found that mSOD1 promotes the aggregation of the dimeric form, thus suggesting the participating role of monomeric form in aggregation process. The analysis of 15 small molecules altered in ALS patients at physiological concentrations, reveals a destabilizing effect in mSOD1 and inhibition of aggregation (eg. Arginine, phthalate, lysine) of dSOD1.

Keywords: Amyotrophic Lateral Sclerosis, Superoxide Dismutase 1, Protein Folding and aggregation, Metal ions.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	V
SUMMARY	VII
ÍNDICE GERAL	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Biossíntese proteica	1
1.1.1. Termodinâmica do <i>folding</i> proteico	2
1.1.2. O papel dos íons metálicos no processo do <i>folding</i> proteico	4
1.1.3. <i>Misfolding</i> e agregação proteica	5
1.1.4. Doenças conformacionais	6
1.1.4.1. Agregação proteica na neurodegeneração	7
1.1.5. Recuperação de defeitos de <i>folding</i> proteico por pequenas moléculas	9
1.2. Superóxido dismutase 1: uma das proteínas envolvidas na Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)	12
1.2.1. Agregação de SOD1 é um indicador da ELA	13
1.2.2. SOD1: Estrutura e <i>folding</i>	14
1.2.3. Modificações pós-traducionais estabilizam a SOD1	15
1.2.4. Mutações na SOD1 associadas à ELA	17
1.2.4.1. A mutação SOD1-G37R	18
1.2.5. O monómero mSOD1 como precursor para a agregação e modelo de estudo	18
1.2.6. Alterações metabólicas associadas à ELA	20
1.3. Métodos de análise estrutural e de estabilidade proteica	21
1.3.1. Detecção da estabilidade proteica (térmica e química)	21
1.3.2. Métodos Biofísicos	23
1.3.2.1. Espectroscopia de Dicroísmo Circular	23
1.3.2.2. Espectroscopia de Fluorescência	24
1.3.2.3. Varrimento Diferencial de Fluorescência (DSF)	24
1.3.3. Anti-corpos conformacionais	26
II. MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.1. Expressão e purificação proteica	29
2.1.1. Expressão e purificação da hSOD1 <i>wt</i> , dímero	29
2.1.2. Expressão e purificação de hSOD1-F50E/G51E e hSOD1-F50E/G51E/G37R	30
2.1.3. Expressão e purificação da TEV protease	30
2.2. Quantificação de metais pelo método de Zincon	31
2.3. Atividade enzimática	32
2.4. Métodos de obtenção do estado Apo da SOD1	32
2.5. Método de análise da estrutura secundária e estabilidade	32
2.6. Método de análise de estabilidade	33
2.7. Método de análise da estrutura terciária	33

2.8. Método de análise da hidrofobicidade	33
2.9. Ensaio cinético de agregação com o fluoróforo Tioflavina-T	33
2.10. Análise de cinéticas de fibrilação	34
2.11. <i>Dot Blot</i>	34
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1. Purificação da forma dimérica da hSOD1 (dSOD1)	35
3.2. Purificação da SOD1-F50E/G51E (mSOD1 <i>wt</i>) e SOD1-F50E/G51E/G37R (mSOD1-G37R)	36
3.3. Análise do conteúdo metálico e atividade enzimática da SOD1	37
3.4. Preparação da forma apo da SOD1	37
3.5. Análise estrutural da SOD1 na forma monomérica e na forma dimérica	38
3.6. Análise da estabilidade da SOD1 na forma monomérica e na forma dimérica	39
3.6.1. Estabilidade térmica	40
3.6.2. Desnaturação química	41
3.7. Efeito dos íons metálicos na estrutura e estabilidade da SOD1 monomérica	42
3.7.1. Efeito do íon zinco na estrutura e estabilidade da SOD1	42
3.7.2. Efeito do íon cobre na estrutura e estabilidade da SOD1	45
3.8. Análise da cinética de agregação do monômero e do dímero SOD1	47
3.8.1. Análise da dependência da cinética de agregação do mSOD1 <i>wt</i> e mSOD1-G37R em função da concentração	47
3.8.2. Comparação da cinética de agregação da forma dimérica e da forma monomérica da SOD1	49
3.8.3. O monômero potencia a agregação do dímero	50
3.9. Influência de metabolitos na estabilidade e agregação da SOD1	52
IV. CONCLUSÕES	59
V. BIBLIOGRAFIA	61
VI. ANEXOS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.1	Representação esquemática do equilíbrio entre a forma nativa e a forma desnaturada de uma proteína	2
Figura 1.2	Forças não-covalentes que estabilizam uma proteína	2
Figura 1.3	Representação do processo de folding sob a perspetiva de um funil.	3
Figura 1.4	Vias para a inserção dos iões metálicos na proteína.	5
Figura 1.5	Esquema do funil energético do processo de <i>folding</i> proteico e agregação.	6
Figura 1.6	Via representativa da formação de fibras, agregados amorfos e oligómeros	7
Figura 1.7	Cinética de agregação de uma fibra.	8
Figura 1.8	Classes gerais do mecanismo de formação de fibras.	9
Figura 1.9	Representação esquemática da interação dos osmólitos com a proteína.	10
Figura 1.10	Esquema representativo dos neurónios motores afetados pela ELA e respetivos músculos associados	12
Figura 1.11	Inclusões e fibras de murganhos transgénicos que contêm SOD1	13
Figura 1.12	Estrutura tridimensional da SOD1.	14
Figura 1.13	Formação do dímero da SOD1.	15
Figura 1.14	Representação esquemática da SOD1 com diferentes mutações associadas à ELA	17
Figura 1.15	Esquema representativo da hipótese de agregação da SOD1, com a forma monomérica como precursor da agregação	18
Figura 1.16	Esquema tridimensional da SOD1 com resíduos F50 e G51 assinalados a verde em cada monómero	19
Figura 1.17	Representação de uma curva de desnaturação.	21
Figura 1.18	Espectros representativos das diferentes estruturas secundárias detetadas por Dicroísmo Circular de UV distante	23
Figura 1.19	Estrutura química do triptofano, ANS e Tioflavina T	24
Figura 1.20	Esquema representativo da técnica de DSF	25
Figura 1.21	Análise de fibras e oligómeros de Aβ42 e Q36 por <i>Dot blot</i> .	26
Figura 3.1	Purificação do mSOD1	35

Figura 3.2	Purificação dSOD1	36
Figura 3.3	Comparação estrutural da forma monomérica e da forma dimérica da SOD1	38
Figura 3.4	Estudos de estabilidade térmica da mSOD1	40
Figura 3.5	Estudos de estabilidade térmica da mSOD1	41
Figura 3.6	Estudos de estabilidade química da mSOD1	41
Figura 3.7	Efeito do íon zinco na estrutura da forma monomérica da SOD1 <i>wt</i> e mSOD1-G37R.	43
Figura 3.8	Efeito do íon zinco na estabilidade química da forma monomérica da SOD1 <i>wt</i> e mSOD1-G37R.	44
Figura 3.9	Efeito do íon cobre na estrutura e estabilidade da forma monomérica da SOD1 <i>wt</i> e mSOD1-G37R.	45
Figura 3.10	Cinéticas de agregação do mSOD1 <i>wt</i> e mSOD1-G37R na presença e ausência de ambiente redutor.	47
Figura 3.11	Cinéticas de agregação do mSOD1 <i>wt</i> e mSOD1-G37R com diferentes concentrações	48
Figura 3.12	Comparação de cinéticas de agregação do dSOD1 e mSOD1, na presença de 5 mM TCEP.	50
Figura 3.13	Comparação de cinéticas de agregação da SOD1 com <i>seeding</i> do monômero	51
Figura 3.14	TCEP induz a conformação monomérica da apoSOD1	52
Figura 3.15	Dependência da estabilidade da SOD1 na presença de metabolitos	54
Figura 3.16	Cinéticas de agregação do dSOD1 na presença de 5 metabolitos	56
Figura 3.17	<i>Dot Blots</i> da dSOD1 na presença de metabolitos e gráficos representativos da percentagem de formação de oligômeros e fibras	57
Figura 6.1	Espectros de CD da SOD1 na presença e na ausência de 5 metabolitos	69
Figura 6.2	Espectros de fluorescência de emissão de triptofano e de emissão do ANS da SOD1, na presença e na ausência de 5 metabolitos	70

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 3.1 Conteúdo metálico e atividades específicas das diferentes formas da SOD1	37
Tabela 3.2 Média dos comprimentos de onda de emissão de fluorescência do triptofano e do fluoróforo ANS	39
Tabela 3.3 Resumo dos valores de T_m e C_m calculadas por CD, DSF e desnaturações químicas das diferentes formas da SOD1	42
Tabela 3.4 Intensidade inicial de fluorescência emitida por ThT na presença de mSOD1 <i>wt</i> e mSOD1-G37R	49
Tabela 3.5 Pequenas moléculas utilizadas para o estudo de estabilidade da SOD1	53
Tabela 6.1 Análise das Intensidades dos <i>dot blots</i> com o anticorpo Anti-A11 (Anti-oligómeros) e com Anti-OC (anti-fibras)	72

ABREVIATURAS

ANS	Ácido 8-anilino-naftaleno-1-sulfônico
Asn	Asparagina
CD	Dicroísmo circular (do inglês <i>Circular Dicroism</i>)
CCS	Chaperão de cobre da SOD
Cis	Cisteína
C _m	Concentração de desnaturação química
DLS	Dispersão dinâmica de Luz (do inglês <i>Dynamic Light scattering</i>)
DO _{600nm}	Densidade óptica a 600 nm
dSOD1	Forma dimérica <i>wild type</i> da SOD1
DSF	Varrimento diferencial de fluorescência (do inglês <i>Differential Scanning Fluorescence</i>)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
EPR	Ressonância Paramagnética Eletrônica (do inglês <i>Electron Paramagnetic Resonance</i>)
GC-TOFMS	Cromatografia gasosa associada à espectroscopia de massa (do inglês <i>Gas Chromatography- Time of Flight Mass Spectroscopy</i>)
FTIR	Espectroscopia vibracional de infravermelho (do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
Glu	Ácido glutâmico
His	Histidina
¹ H-MRS	Espectroscopia de ressonância magnética de prótons (do inglês <i>¹H -Magnetic Resonance Spectroscopy</i>)
ICP	Plasma acoplado induzido (do inglês <i>Inductively Coupled Plasma</i>)
IPTG	Isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosídeo
K _{app}	Velocidade aparente de agregação
mSOD1 wt	Forma monomérica <i>wild type</i> da SOD1
mSOD1-G37R	Forma monomérica da SOD1, com a mutação G37R
PCR	Reação em cadeia de polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluorido
SDS-PAGE	Sódio Dodecil Sulfato - Gel Electroforese de Poliacrilamida
SOD1	Superóxido dismutase 1
TEM	Microscopia de transmissão eletrônica (do inglês <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TCEP	Tris-[2-carboxietil]-fosfina
t _{lag}	Tempo de <i>lag phase</i>
ThT	Tioflavina T (3,6 – dimetilbenzotiazol-2-il)-N,N dimetilanilina)

TMAO	N-Óxido de trimetilamina
T _m	Temperatura de desnaturação
UV	Ultra violeta

I. INTRODUÇÃO

A introdução desta dissertação encontra-se dividida em três secções. A secção 1.1 aborda a biossíntese proteica e aspetos fundamentais do processo de *folding*. Descreve-se o papel dos iões metálicos do processo de *folding* de algumas proteínas e aborda-se uma das consequências do *misfolding* das proteínas, a agregação proteica. Na secção 1.2 apresenta-se o modelo de estudo, a Superóxido Dismutase 1 (SOD1) e o seu envolvimento na doença neurodegenerativa, Esclerose Lateral Amiotrófica. Na secção 1.3 descrevem-se alguns métodos biofísicos que permitem estudar e monitorizar o *folding* proteico.

1.1. Biossíntese proteica

As proteínas são as macromoléculas biológicas mais abundantes e também as mais complexas em termos conformacionais. A sua atividade biológica depende da capacidade da cadeia polipeptídica adquirir uma estrutura tridimensional única. Para tal, é necessário que ocorra o *folding* proteico. O *folding* proteico é o processo físico através do qual a cadeia polipeptídica adquire uma conformação nativa, estabelecendo várias interações, ditadas pela composição da sequência primária da proteína. O estado nativo apresenta-se como a estrutura mais estável da proteína em condições fisiológicas, com uma estrutura tri-dimensional bem ordenada, enquanto que o estado desnaturado é o estado da proteína mais desordenado [1].

O *folding* das proteínas é um processo fundamental em todas as células, uma vez que os processos biológicos são dependentes da maquinaria proteica. Porém, mesmo no ambiente celular existe uma fração de proteínas sintetizadas que falha neste processo e que não consegue atingir a forma nativa necessária para o correto desempenho biológico. Esta incapacidade pode levar a severas consequências biológicas e a doenças conformacionais causadas por *misfold* proteico, tal como as doenças associadas com a agregação proteica, como Alzheimer, Parkinson e a Esclerose Lateral Amiotrófica [2].

O chamado “problema do *folding*” é um assunto muito debatido na comunidade científica e muito importante para desvendar o mecanismo de várias doenças, bem como entender o papel dos cofatores no *folding* e na estabilidade. Baseia-se em questões relacionadas com a energia estabilizadora do *folding* da proteína e com o mecanismo do *folding* da proteína. A proteína apesar de conter toda a informação necessária para o *folding* na sua estrutura primária, contém vários graus de liberdade conformacional na natureza da cadeia polipeptídica, heterogeneidade na sequência de aminoácidos e diferentes interações que estabilizam a conformação, que torna difícil a previsão do mecanismo da formação da sua estrutura.

1.1.1. Termodinâmica do *folding* proteico

Sob condições fisiológicas, a forma nativa e a forma desnaturada da proteína estão em constante equilíbrio (Figura 1.1):



Figura 1.1: Representação esquemática do equilíbrio entre a forma nativa e a forma desnaturada de uma proteína.

O estado desnaturado da proteína tem uma elevada entropia conformacional, causada pela possibilidade de adotar várias conformações. Para existir a estabilização do estado nativo é necessário diminuir a entropia conformacional. Para tal a proteína necessita de superar as forças que favorecem o estado desnaturado, principalmente a entropia conformacional, através do aumento das forças intramoleculares. As forças que favorecem o estado nativo são de várias naturezas, como interações intramoleculares: ligações hidrofóbicas, ligações hidrofílicas e ligações iônicas. Mas também interações intermoleculares, como ligações de hidrogénio e ligações van der Waals [3], que estão representadas na figura 1.2.

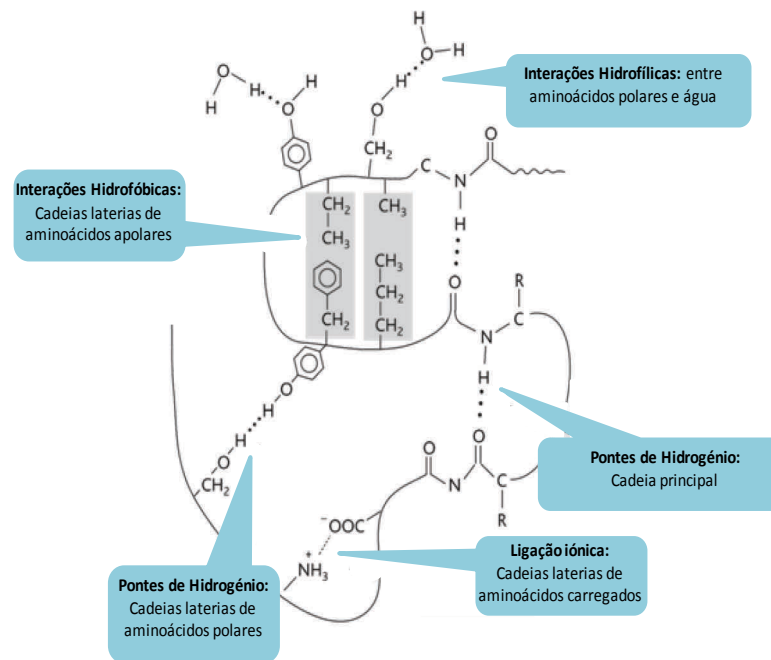


Figura 1.2: Forças não-covalentes que estabilizam uma proteína. Adaptado de [4].

Em alguns casos as conformações nativas, além das forças não covalentes, também são estabilizadas por contribuições adicionais, tais como, as ligações dissulfídicas, oligomerização e modificações pós-traducionais, como a ligação de cofatores.

O equilíbrio entre a forma nativa e a forma desnaturada pode ser descrito pela equação termodinâmica geral (Equação 1):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Equação 1})$$

Onde ΔH representa a variação da energia livre, resultante de contribuições de ligações químicas e interações e $-T\Delta S$ representa a variação da energia livre, resultante de variações no grau de ordem dentro do sistema [3].

As forças que originam o *folding* proteico procuram conformações de mais baixo nível de energia. Cada proteína tem o seu mecanismo de *folding* específico e existem várias vias para atingir a energia mínima. Por vezes a cadeia polipeptídica pode necessitar de adotar conformações intermediárias para originar o estado nativo. Este processo pode ser desconstruído em várias trajetórias com o fim de formar o estado nativo [5]. Existem proteínas cujo *folding* apresenta armadilhas cinéticas (barreiras de elevada energia), indicativa da presença de possíveis estados intermediários estáveis até se atingir a topologia final (Figura 1.3) [3, 6].

Este mecanismo pode ser visualizado através do modelo do funil energético, proposto por Wolynes [7]. De acordo com esta teoria o topo do funil possui um conjunto de conformações desnaturadas que são caracterizadas por elevada energia e por um nível de entropia conformacional elevado. Por outro lado a conformação nativa situa-se no fundo do funil, num estado energético mínimo, resultado de múltiplas interações electrostáticas de pequena magnitude e interações hidrofóbicas, cujo efeito aditivo permite estabilizar a componente entálpica que interatua com a componente entrópica (Figura 1.3). Os graus de liberdade conformacional da cadeia polipeptídica vão-se reduzindo à medida que as conformações da proteína se aproximam da forma nativa [3].

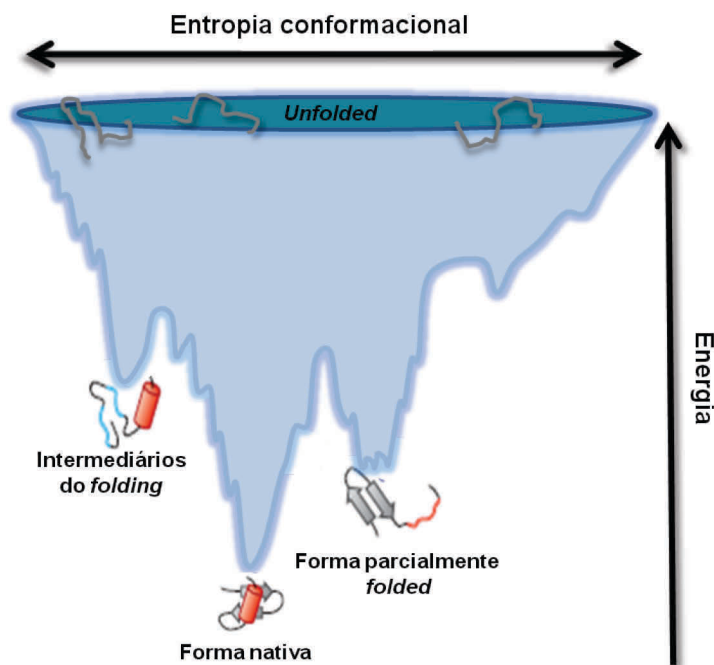


Figura 1.3: Representação do processo de *folding* proteico considerando o modelo do funil energético. Existem vários percursos possíveis para formar a forma nativa, que corresponde à forma com menor energia e menor entropia conformacional, a forma mais estável. Adaptado de [8].

1.1.2. O papel dos íons metálicos no processo do *folding* proteico

Cerca de 30% das proteínas necessitam dos íons metálicos para a sua estrutura ou para realizar a sua função catalítica, as chamadas metaloproteínas. Os íons metálicos atuam como elementos estabilizadores da estrutura da proteína. Esta função pode contribuir para a manutenção do *folding* mas também pode ser essencial na nucleação da proteína durante o *folding in vivo* [9].

A concentração dos íons metálicos na célula é altamente controlada e existe uma complexa maquinaria proteica envolvida na manutenção da homeostase destas moléculas. Especificamente, a distribuição dos íons metálicos pelas proteínas é assegurada por um grupo de proteínas chamadas metalochaperões [3].

A associação entre o íon metálico e a proteína envolve interações electroestáticas e dipolares através de combinações específicas de resíduos, construindo um padrão de coordenação que forma o centro de ligação proteína-metal. Alternativamente, esta interação pode ser estabelecida indiretamente através de um *cluster* metálico (ex. centro de ferro-enxofre) ou por um grande grupo químico (ex. cofator hémico). Independentemente das condições, a interação metal-proteína influencia a termodinâmica do *folding* proteico e modula a conformação e dinâmica da proteína, estabilizando-a, visto que impõe restrições conformacionais que diminuem a entropia do estado desnaturado e que favorecem a reação do *folding* [3].

O primeiro passo para entender a relação entre a ligação dos íons metálicos e o *folding* é compreender qual o mecanismo de ligação dos metais à proteína. Os íons metálicos podem-se ligar à proteína em diferentes estádios da reação do *folding*, e existem vários modos de ligação que são possíveis (Figura 1.4) [10].

Algumas metaloproteínas são capazes de realizar o *folding* na ausência de íons metálicos, nesta condição o íon metálico é necessário para reajustamentos conformacionais, essenciais para a função da proteína ou para propósitos catalíticos (Figura 1.4 – A). Noutros casos a proteína sintetizada não é capaz de adquirir a estrutura sem os metais (Figura 1.2 – B). Exemplos dessas proteínas são as metaloproteínas que contêm domínios *zinc fingers*, que só se conseguem enrolar no estado nativo na presença de zinco. Por outro lado, os íons metálicos podem-se ligar à cadeia polipeptídica nascente que emerge do ribossoma, para formar um estado intermediário metalado ou mesmo para formar o estado nativo (Figura 1.4 – C) [10].

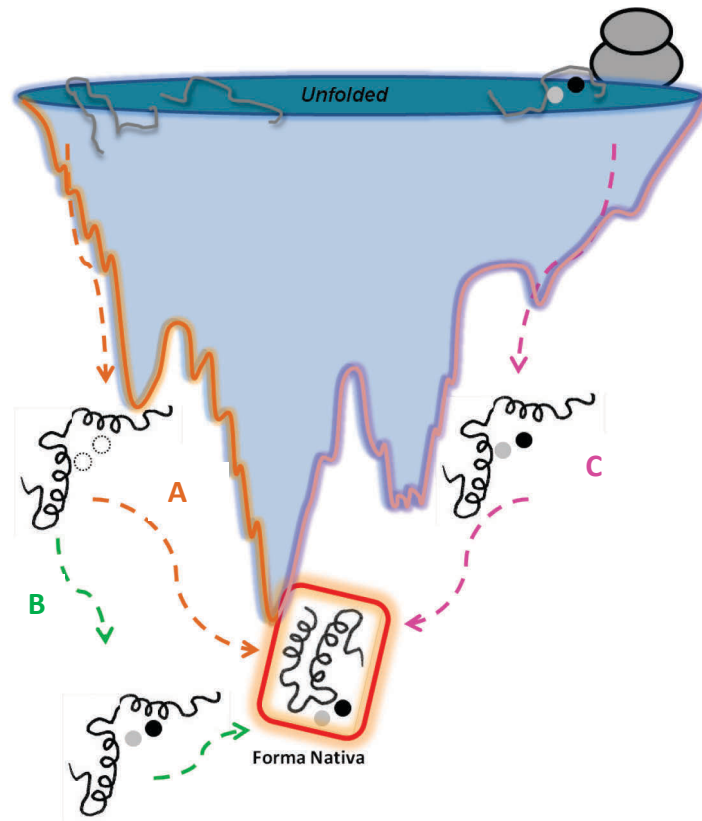


Figura 1.4: Vias para a inserção dos íons metálicos na proteína. Os metais podem ser inseridos por transferência de íons metálicos livres dentro da célula ou através de metalochaperões. A inserção do íon metálico pode optar por três vias distintas: (A) depois da cadeia polipeptídica adotar a sua conformação final (---); (B) após a libertação de intermediários parcialmente *folded* onde a inserção do metal potencia a nucleação para o estado nativo (---); (C) durante o processo de tradução a cadeia polipeptídica, que pode resultar um estado intermediário metalado ou na forma nativa (---). Adaptado de [3].

Existem cofatores metálicos que se ligam fortemente e permanentemente à proteína e são cruciais para a manutenção da estrutura desta. Contudo existem proteínas que ligam e libertam os metais de acordo com o gradiente de concentração de metais. Nestes casos a ligação pode ser associada com alterações conformacionais da proteína. A ligação do cofator metálico em diferentes estádios do *folding* ocorre na célula e é determinado por diferentes necessidades biológicas.

1.1.3. *Misfolding* e agregação proteica

A agregação resulta da associação entre conformações proteicas não nativas, através de contatos intermoleculares. Podendo resultar na formação de oligómeros, agregados amorfos ou agregados fibrilares altamente ordenados, chamados amilóides. A formação de fibras amilóides é, na grande maioria dos casos, tóxica para as células e dá origem à maior parte das doenças neurodegenerativas (Figura 1.5) [8].

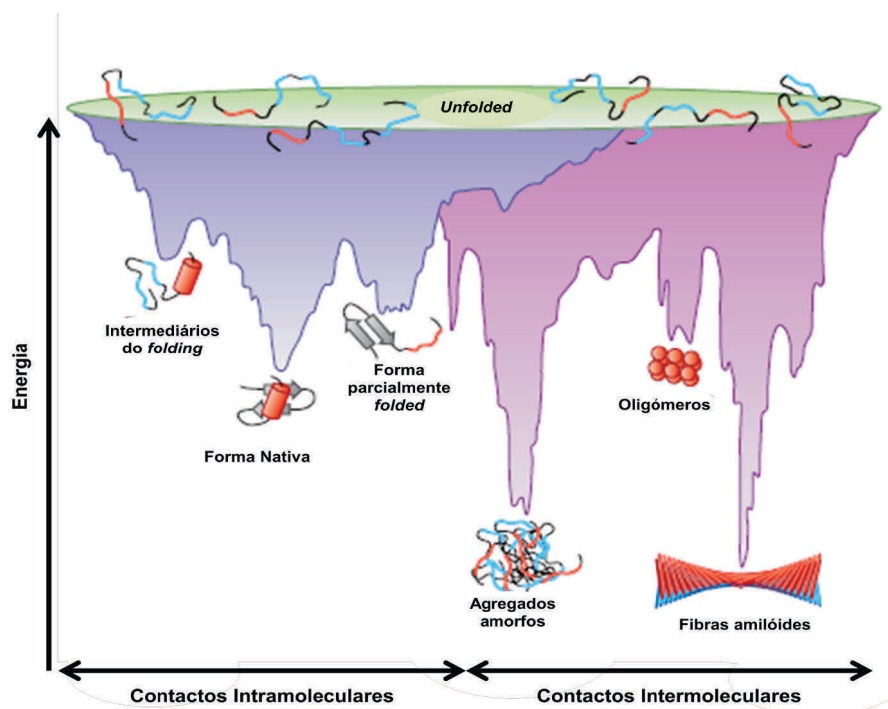


Figura 1.5: Esquema do funil energético do processo de *folding* proteico e agregação. A superfície azul mostra as várias conformações intermediárias que a proteína tem até se formar o estado nativo, através das interações intramoleculares. A superfície rosa mostra as diferentes conformações do processo de agregação, através de contactos intermoleculares. Adaptado de [8].

Existe um ambiente químico altamente populado na célula, existindo cerca de 300-400g/L de proteínas e outras macromoléculas no interior da célula, que aumentam substancialmente a afinidade para interações entre proteínas, resultando na agregação. As formas não nativas do *folding* e proteínas parcialmente *folded* têm mais propensão para agregar, uma vez que têm as regiões hidrofóbicas mais expostas e têm a cadeia polipeptídica pouco estruturada, que promovem as ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas entre as diferentes cadeias polipeptídicas [8].

Os *molten globule* são um dos intermediários na via do *folding* das proteínas. Estes intermediários são compactos, com elevada estrutura secundária nativa, mas com pouca ou nenhuma estrutura terciária, contendo zonas hidrofóbicas expostas [11]. Foi demonstrado que este tipo de intermediários pode potenciar a agregação na neurodegeneração [12-14]. Como exemplo, a ligação do cobre e ferro à α sinucleína leva à formação de um *molten globule*, o que resulta num aumento da cinética de agregação e na doença neurodegenerativa [13].

A deteção e caracterização de intermediários conformacionais é um dos pré-requisitos para descobrir o mecanismo de várias doenças caracterizadas pela agregação proteica, pois estes poderão ser os potenciadores da agregação [8].

1.1.4. Doenças conformacionais

Um grande número de doenças é causada pelo *misfolding* de proteínas e são, geralmente, referidas como doenças conformacionais. As doenças conformacionais podem ser causadas por perda ou por ganho de função da proteína. Tipicamente as doenças associadas com perda de função, como a fibrose quística, resultam de um aumento da degradação proteolítica da proteína alvo. Se a proteína está no estado *misfolded* e é incapaz de voltar ao

estado nativo é degradada pelo sistema proteolítico, resultando num nível funcional da proteína reduzido. Contrariamente, quando o *misfold* de uma proteína conduz a um ganho de função da proteína alvo é-lhe atribuída citotoxicidade. Este ganho de função pode promover interações proteína-proteína que poderão provocar a agregação proteica. Sugere-se que algumas doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, Parkinson e a Esclerose Lateral Amiotrófica, são doenças conformacionais causadas por ganho de função da proteína [2, 15] .

1.1.4.1. Agregação proteica na neurodegeneração

As doenças neurodegenerativas são, geralmente, caracterizadas pela presença de diferentes tipos de agregados, incluindo fibras amilóides e agregados amorfos. Porém a principal questão é qual o processo que inicia a agregação [16].

O início da agregação pode ser causado por vários fatores que irão resultar na destabilização da proteína. Exemplos destes fatores são (i) mutações nas proteínas; (ii) modificações covalentes da proteína, tal como fosforilações; (iii) e modificações oxidativas da proteína, associadas com o processo de envelhecimento [16].

Inicialmente as fibras amilóides maduras encontradas em doentes com doenças neurodegenerativas eram identificadas como entidades tóxicas. Contudo este conceito tem-se vindo a alterar, visto que foram encontrados pequenos oligómeros tão tóxicos como as fibras [17]. Recentemente existe uma corrente científica que sugere que a deposição proteica poderá ter início em oligómeros não-fibrilares, que resultam na formação posterior de fibras. Estes precursores podem ser potencialmente tóxicos e constituir espécies primárias que irão contribuir para a doença [3]. Contudo a relação entre a neurotoxicidade e os agentes que despoletam a toxicidade ainda está em discussão.

Estudos sugerem que o processo de agregação envolve vários intermediários e resulta em diferentes tipos de fibras. A figura 1.6. descreve uma possível via para a formação de fibras e outra via para a formação de agregados e oligómeros.

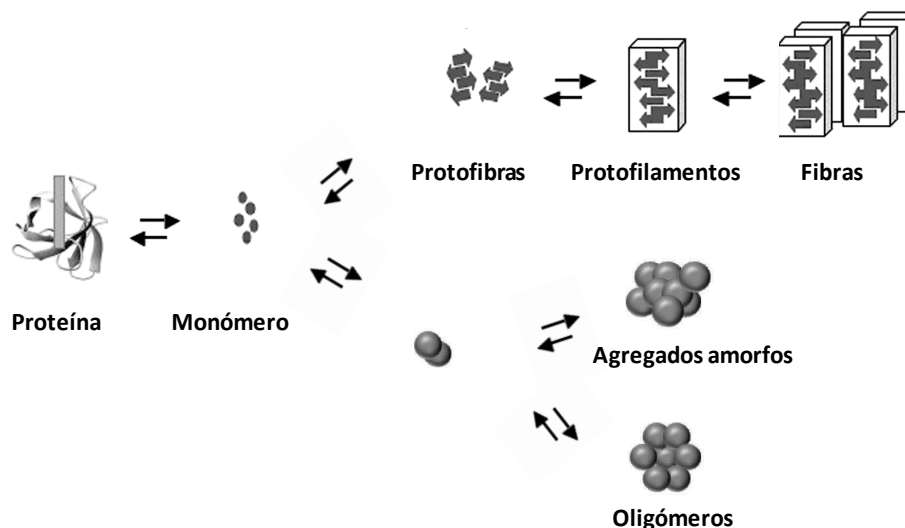


Figura 1.6: Via representativa da formação de fibras, agregados amorfos e oligómeros. A formação de agregados envolve vários intermediários.

As fibras amilóides são tipicamente fibras ordenadas, sem ramificações, com uma espessura de cerca de 7 a 12 nm. Têm uma estrutura constituída, principalmente por folhas β .

As cadeias β associam-se à fibra existente perpendicularmente, formando ligações de hidrogênio intramoleculares, construindo uma estrutura *cross- β* . A morfologia das fibras e consequentemente a sua patologia podem variar dependendo das condições celulares, sendo os íons metálicos um dos agentes que podem afetar a morfologia das fibras [17].

Em oposição às fibras, os oligômeros são altamente heterogêneos e estruturalmente desorganizados, permitindo a exposição de sequências de aminoácidos que participam em interações aberrantes com outros componentes celulares. Exemplos incluem, (i) exposição de frações amiloidogênicas com potencial de potenciar a agregação de outras proteínas; (ii) ligação aberrante de íons metálicos e (iii) a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Contudo estes oligômeros podem ser precursores de fibras amilóides ou podem ser resultado de fragmentação de fibras [3].

Um dos desafios no estudo da agregação proteica é relacionar medidas experimentais *in vitro* com o mecanismo de agregação dentro da célula, visto que cada sistema contém um grande número de espécies moleculares com diferentes estratégias de polimerização que se podem converter em múltiplos processos. Um grande avanço do entendimento da fibrilação proteica está a ser alcançado através do estudo das cinéticas de agregação que governam as vias de agregação [18].

A cinética de formação das fibras amilóides é descrita como uma reação de polimerização, dependente da nucleação. Este processo envolve geralmente várias etapas. Primeiramente existe a formação de um núcleo através da agregação de monómeros, a chamada nucleação. Segue-se um crescimento rápido, onde o final da fibra existente recruta espécies monoméricas, aumentando o comprimento da fibra, o alongamento. E poderá ainda existir o processo de dissociação ou degradação, que leva à diminuição ou ao desaparecimento dos agregados. Ainda existe um debate a cerca da natureza da forma mínima que dá origem ao núcleo e que potencia a formação das fibras. Sugestões envolvem espécies monoméricas *misfolded*, dímeros ou oligômeros [18].

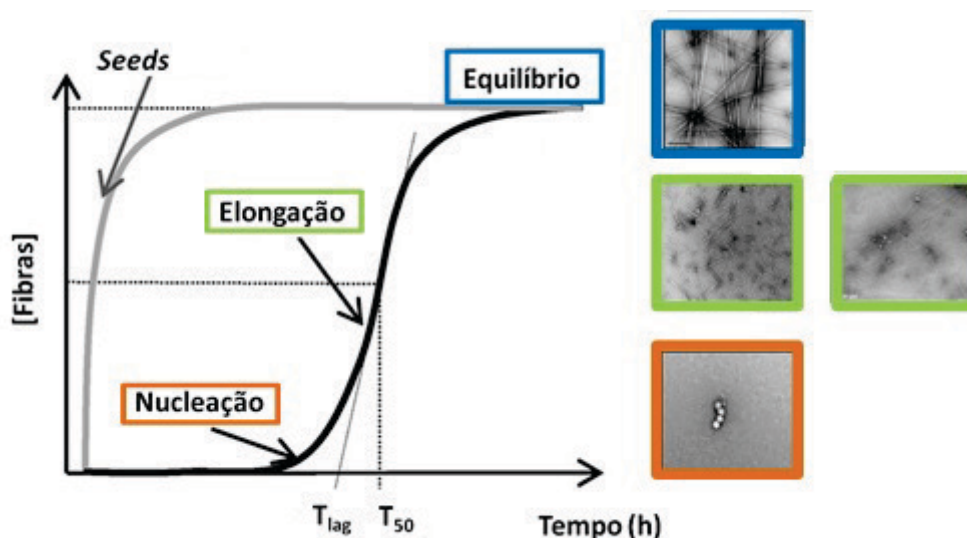


Figura 1.7: Modelo geral de uma cinética de agregação de uma fibra. Reação de nucleação-polimerização é caracterizada por uma curva de crescimento sigmoidal, com uma fase de nucleação e de alongamento. A formação da fibra é iniciada muito lentamente, contudo a adição de um agente *seed* pode formar rapidamente fibras, até chegar um equilíbrio, com pequenas quantidades de monómero em solução. Na figura estão demonstradas imagens de TEM dos agregados formados nas diferentes etapas da agregação. Adaptado de [17, 19]

A cinética de formação de fibras *in vitro* segue, tipicamente, uma curva sigmoidal de crescimento. Esta curva de crescimento inclui uma *lag phase*, correspondente à nucleação, e uma velocidade máxima de crescimento, que corresponde à elongação. O crescimento das fibras depois da elongação alcançam um equilíbrio, onde estão presentes quantidades mínimas de monómero. Uma característica fundamental da reação de polimerização dependente da nucleação é a capacidade de pequenas quantidades de fibras pré-formadas realizarem um *seeding* da reação, reduzindo significativamente a *lag phase* (Figura 1.7) [18].

O processo de agregação difere entre proteínas. Existem proteínas cujo processo de nucleação consiste na ligação de monómeros ao agregado já existente, a chamada nucleação homogênea (primária). O estudo da polimerização linear da actina, por Oosawa, foi um dos estudos mais relevantes para descrever este tipo de nucleação. Porém também existe a nucleação heterogênea e fragmentação de filamentos, que permite que novos agregados possam ser formados através de um processo que envolve agregados já existentes. Este conceito foi revelado por Eaton, Ferrone e Hofrichter aquando o estudo da polimerização da Hemoglobina S (Figura 1.8) [18].

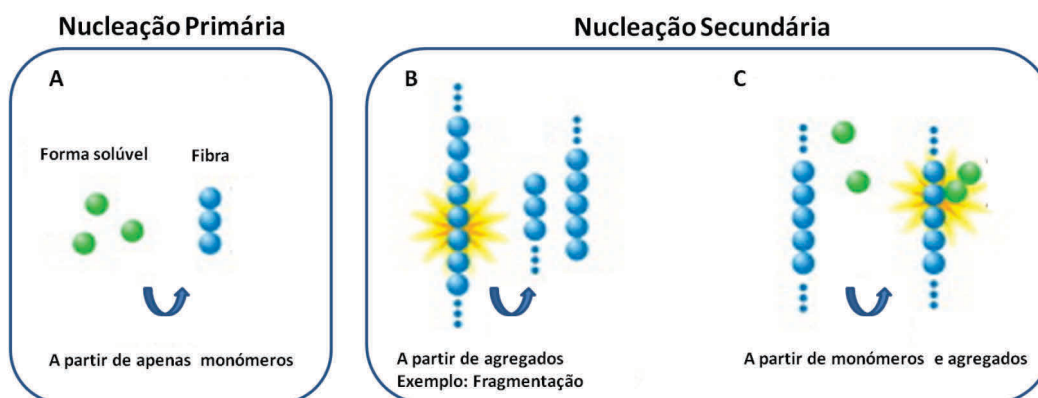


Figura 1.8: Classes gerais do mecanismo de formação de fibras. A – Nucleação primária, resulta na formação de novos agregados a partir de interações apenas entre monómeros solúveis; B – Processos secundários independentes do monómero, como a fragmentação, geram novos agregados a uma velocidade dependente apenas da concentração de agregados; C – Processos secundários dependentes do monómero criam agregados a uma velocidade dependente da concentração do monómero e de agregados já existentes. Adaptado de [18].

1.1.5. Recuperação de defeitos de *folding* proteico por pequenas moléculas

Na célula existe uma maquinaria cuja função assegura que o *folding* seja eficaz, os chaperões moleculares fazem parte deste conjunto. Estes são definidos como uma proteína que interage, estabiliza ou ajuda a proteína não-nativa a adquirir a sua conformação nativa. A ligação da proteína ao chaperão pode inibir a agregação e reduzir a concentração de conformações parcialmente *folded* [8].

Quando a proteína perde a conformação e não é possível a recuperação do *folding* pelo chaperão esta pode exercer um efeito patológico que causa uma deficiência na função biológica, como a degradação acelerada ou acumulação de agregados tóxicos. Contudo existem estratégias terapêuticas que mimetizam a função dos chaperões moleculares. Uma delas é o uso de pequenas moléculas, chamadas chaperões químicos e farmacológicos. O objetivo destas moléculas é resgatar as conformações nativas das proteínas ou induzir a

estabilidade de estados intermediários. Estratégias baseadas nestas moléculas são muito importantes nas doenças conformacionais, como as doenças neurodegenerativas. Os chaperões químicos atuam inespecificamente e não se ligam à proteína e os chaperões farmacológicos atuam de um modo mais específico e direto sob uma proteína alvo [20]. No âmbito da minha tese irei focar-me apenas nos chaperões químicos.

Os chaperões químicos englobam pequenas moléculas de baixa massa molecular, que não contém informação que determine o processo de *folding* de uma proteína. Podem ser divididos em três classes de compostos orgânicos [21]:

- Carbohidratos, incluindo glicerol, sorbitol, arabitol, mio-inositol e trealose;
- Aminoácidos livres e derivados, tais como, a glicina, alanina, taurina;
- Metilalaninas, como a betaina e TMAO.

Muitos destes compostos são sintetizados ou absorvidos pelo organismo sem alterar a sua atividade funcional. Todas as moléculas das duas primeiras classes são frequentemente referidas como solutos compatíveis, considerando que estes se acumulam dentro da célula sem afetarem a função de outras macromoléculas [20].

A sua ação pode resultar num efeito de hidratação, causado pela capacidade das moléculas de água estabelecerem interações com os grupos polares da cadeia principal da proteína, aumentando a compactação desta (Figura 1.9). Os osmólitos são excluídos da superfície da proteína forçando a proteína a adotar uma estrutura *folded* compacta com o mínimo de área superficial exposta, tendo o osmólito um efeito estabilizador. Todavia quando existe uma ligação preferencial do osmólito à cadeia da proteína, o equilíbrio desloca-se para o estado desnaturado e o osmólito tem um efeito destabilizador [20, 22].

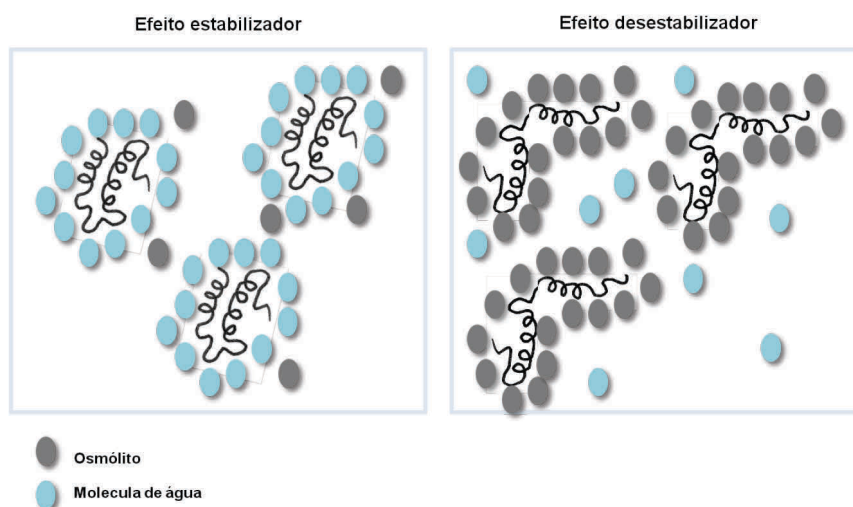


Figura 1.9: Representação esquemática da interação dos osmólitos com a proteína.

O efeito estabilizador/destabilizador dos osmólitos depende de vários fatores, entre os quais: (i) a concentração do osmólito, visto que um aumento de concentração do osmólito mimetiza o *crowding* celular [23]; (ii) dependência do pH [24-25]; e finalmente (iii) o tamanho das moléculas dos osmólitos também afeta o poder de estabilização do osmólito [26]. Contudo elevadas concentrações de osmólitos são tóxicas para a célula e difíceis de atingir em condições *in vivo* [27].

Como o mecanismo de ação destas pequenas moléculas não é específico, o mesmo composto pode ter diferentes efeitos em diferentes estados do processo de folding ou efeitos opostos em diferentes proteínas.

1.2. Superóxido dismutase 1: uma das proteínas envolvidas na Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa fatal, caracterizada pela morte seletiva de neurónios motores (Figura 1.10). Os sintomas predominantes são a atrofia muscular progressiva, paralisia e morte. Contudo não existe, ainda, cura ou tratamento efetivo para esta doença. Cerca de 80 a 90% dos casos de ELA não têm componente genética ou causa conhecida e são chamados esporádicos. Os restantes 10% a 20% dos casos têm origem familiar e são causados por mutações em vários genes. Nos casos familiares, aproximadamente 25% são causados por mutações no gene da Superóxido Dismutase 1 (SOD1), que representa o exemplo mais estudado. [28-29]. As duas formas da doença partilham a mesma via de neurodegeneração e são clinicamente e patologicamente indistinguíveis, sugerindo que têm um mecanismo semelhante para gerar a doença.

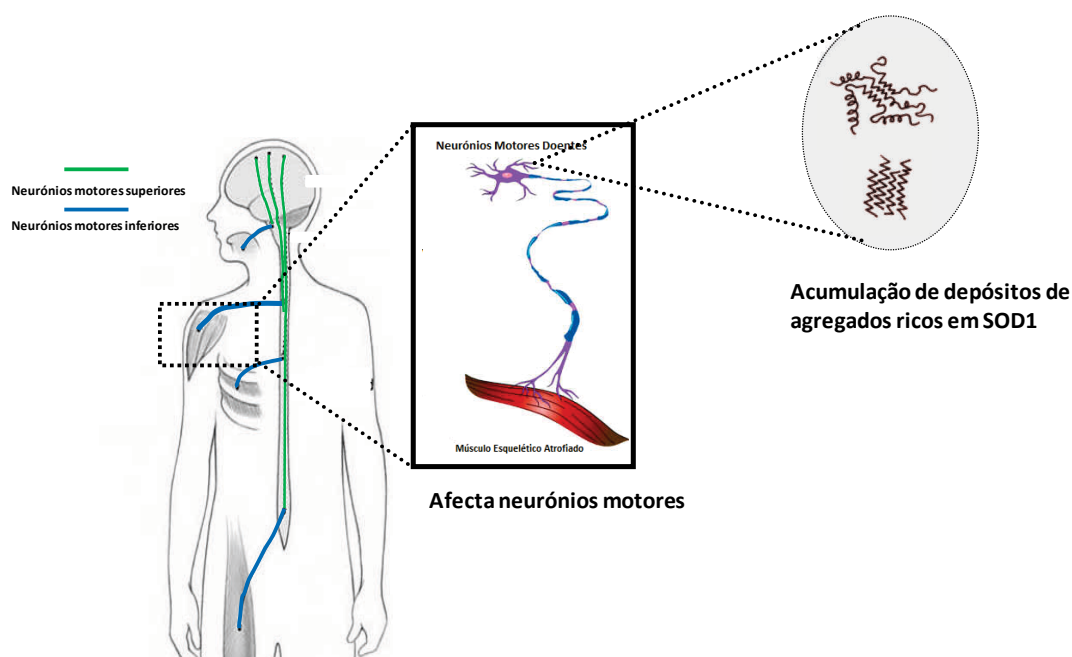


Figura 1.10: Esquema representativo dos neurónios motores afetados pela ELA e respetivos músculos associados. Entre os músculos afetados encontram-se os músculos dos membros inferiores, superiores, língua e músculos peitorais envolvidos na respiração.

A SOD1 é uma proteína antioxidante, que catalisa a dismutação do anião superóxido em peróxido de hidrogénio e oxigénio molecular, na célula. A sua concentração intracelular é relativamente elevada, entre 10 e 100 μM e aparentemente suficiente para consumir os níveis fisiológicos do radical superóxido [30] :



Foram descobertas mais de 100 mutações no gene codificante para a SOD1 que causam ELA, distribuídas em toda a cadeia polipeptídica, que afetam o início, a duração e a severidade dos sintomas [28]. Contudo a disfunção neuronal patológica não está assente na perda da função enzimática da SOD1, visto que modelos de murganhos sem do gene *sod1* não exibem sintomas patológicos da ELA [31], mas sim num ganho de propriedades tóxicas pelas SOD1 mutadas. Estudos sugerem que a patologia desta doença não é baseada na perda de

função enzimática da SOD1, mas sim no ganho de propriedades tóxicas pela SOD1 mutada, podendo existir uma relação entre o *misfolding* da SOD1 e a doença [3].

1.2.1. Agregação de SOD1 é um indicador da ELA

Existem vários mecanismos propostos para explicar a morte seletiva dos neurónios motores na ELA, incluindo *stress* oxidativo, disfunções mitocondriais e agregação proteica [32]. Neste trabalho irei-me focar na hipótese de agregação proteica.

Existem muitos dos estudos relacionados com a hipótese de agregação proteica na ELA devido à presença de inclusões proteicas na medula espinal de pacientes com ELA, semelhantes a inclusões de doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer [28] (Figura 1.11). Estas inclusões proteicas são ricas em SOD1, quer na forma *wild type*, quer na forma mutada, podendo-se sugerir que a SOD1 poderá ter um papel relevante na doença e que a ELA poderá ser uma doença conformacional [3].

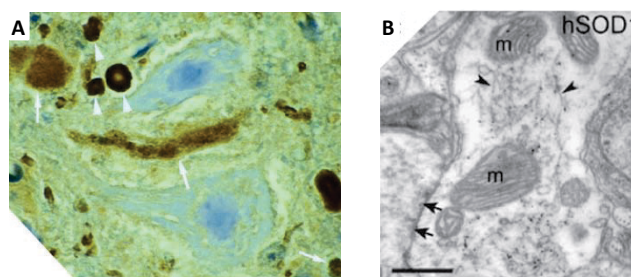


Figura 1.11: Inclusões e fibras de murganhos transgênicos que contêm SOD1. (A) Inclusão da medula espinal de um rato que expressava o mutante SOD1-G85R, visualizado por *staining* com o anticorpo que reconhece SOD1; (B) Inclusões de natureza fibrilar visualizadas por microscopia eletrónica. Adaptado de [28].

À primeira vista a SOD1 não se assemelha a um candidato para a participação em qualquer processo de agregação proteica, visto que é uma proteína altamente estável. Contudo a ausência dos cofatores metálicos e/ou redução da ligação dissulfídica provocam uma diminuição drástica da sua estabilidade. É esta forma, sem metais, que poderá potenciar a agregação. Contudo também existem estudos que supõem que a agregação poderá ser potenciada por precursores monoméricos globalmente desnaturados ou pela associação destes, por difusão, a fibras já existentes [33-34].

Estudos em murganhos transgênicos que expressam SOD1 mutada concluíram que a sobre-expressão da forma *wild type* da SOD1 não reduz os sintomas da ELA. Suportando esta teoria, Bruijn *et al.* observou agregados constituídos por SOD1 na forma *wild type* e com mutações associadas à ELA, em sistemas de células e em murganhos transgênicos [28, 35-36]. Examinar os fatores que levam à conversão de SOD1 solúvel em agregados pode ajudar a determinar os eventos moleculares nos neurónios motores que despoletam uma cascata de eventos que resultam em degeneração.

1.2.2. SOD1: Estrutura e *folding*

SOD1 é uma proteína antioxidante, expressa ubiquamente em todos os tecidos e localizada principalmente no citosol de células eucariotas. Esta enzima humana é homodimérica com 32 KDa, contém um íon cobre com função catalítica e um íon zinco com função estrutural, ligados a cada monômero. Contém também uma ligação dissulfídrica oxidada em cada monômero, fundamental para a dimerização da proteína (Figura 1.12) [28].

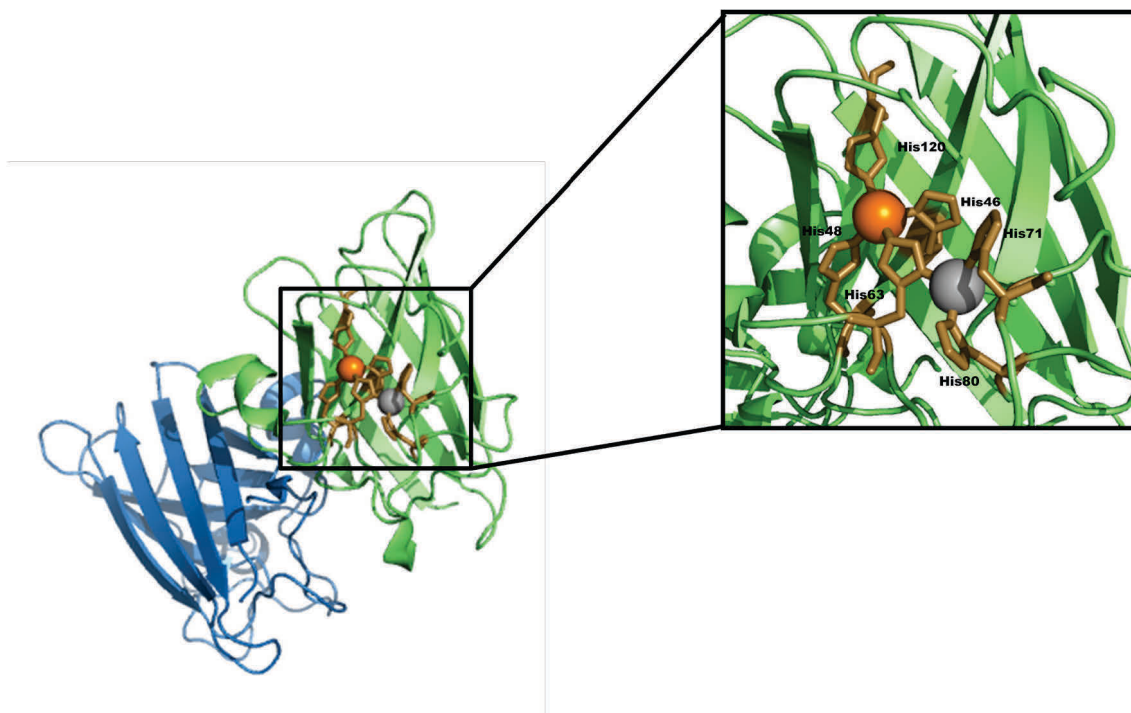


Figura 1.12: Estrutura tridimensional da SOD1 (PDB ID: 1SPD). O íon cobre e o íon zinco estão assinalados como esferas cor-de-laranja e cinza, respectivamente. Estão representados também os resíduos responsáveis pela ligação dos íons metálicos. A estrutura foi obtida usando o programa *Pymol*.

A cadeia polipeptídica da SOD1 é enrolada num padrão em forma de barril, constituído por 8 folhas β interligadas por *loops*. Existem dois *loops* que têm grande importância funcional – o *loop* electrostático e o *loop* de zinco. O enrolamento em barril β é mantido na ausência dos cofatores metálicos e da ligação dissulfídica [28].

O *loop* electrostático comprime resíduos polares cruciais para auxiliar o transporte eletrostático do substrato para o centro ativo. O zinco é coordenado por três histidinas e um resíduo de aspartato que formam o *loop* de zinco. Um desses resíduos de histidina, a His63, coordena simultaneamente o cobre, através de uma cadeia lateral de imidazol e em conjunto com três outros resíduos de histidina mantêm o íon cobre numa geometria quadrangular plana. É de notar que todos os resíduos que ligam o zinco estão numa região do *loop* conformacionalmente flexível, mas três dos quatro ligandos do cobre estão estruturados na folha β , com ou sem a presença do metal [28]. A ligação dissulfídica intra-subunidade liga covalentemente o *loop* de zinco ao barril β através das cisteínas Cis57 e Cis146. Está comprovado que a ligação dissulfídica providencia elementos estruturais importantes que mantêm a interface dimérica.

1.2.3. Modificações pós-traducionais estabilizam a SOD1

As modificações pós-traducionais são cruciais para o *folding* e manutenção da conformação *wild type* da SOD1. Estas modificações incluem a ligação dos íons metálicos, cobre e zinco, e a ligação dissulfídrica. A ausência destas modificações promove a agregação da SOD1 e parece ser um pré-requisito para o *misfolding* patogénico na ELA [37-38]. Conhecer os mecanismos de aquisição dos íons metálicos e a dependência destes cofatores para a estabilidade da proteína poderá ser importante para entender o mecanismo de agregação da SOD1.

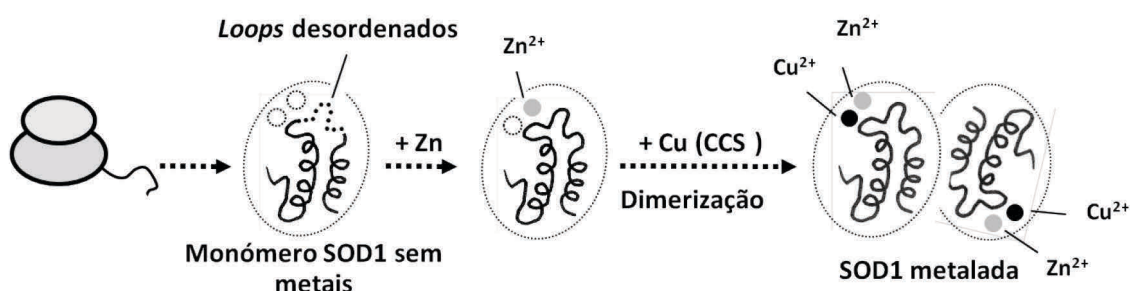


Figura 1.13: Formação do dímero da SOD1. O monómero enrola-se numa conformação sem metais nativa, que contém *loops* desordenados e é propensa a agregar. A inserção do zinco organiza conformacionalmente os *loops* seguindo-se a inserção do cobre via chaperão CCS e a formação da ligação dissulfídica intrasubunidade e dimerização. Adaptado de [3].

Está proposto que a formação do estado nativo da SOD1 envolve, primeiramente a estabilização do monómero, através da inserção do íon zinco, que ordena o *loop* de zinco e minimiza a sua dinâmica local. Posteriormente há a adição do íon cobre com o auxílio do chaperão CCS e dimerização (Figura 1.13).

Estudos de termoestabilidade concluíram que a SOD1 metalada é muito estável, com uma temperatura de desnaturação (T_m) por volta dos 90°C, sendo pouco provável que esta forma da proteína esteja envolvida na agregação. Porém com a remoção do íon cobre há uma diminuição do T_m para 70°C e com a remoção dos dois metais há uma destabilização ainda mais drástica, que provoca uma diminuição do T_m por volta dos 55°C [39]. Concordante com este estudo, simulações computacionais observaram que a ausência de íons metálicos aumenta a propensão para a agregação, tanto do monómero, como do dímero, visto que existe um maior nível de desordem dos *loops* e que a SOD1 metalada dissocia-se a concentrações de desnaturante mais elevadas que a SOD1 sem metais [33]. Adicionalmente, foi reportado que a SOD1, na ausência de metais com a ligação dissulfídica intacta [40] ou reduzida forma agregados sob condições fisiológicas [41].

Zinco

Estudos termodinâmicos e cinéticos demonstraram que a ligação do zinco à SOD1 diminui a energia livre da SOD1, tanto na forma monomérica, como na forma dimérica e diminui os estados intermediários em elevadas energias livres. Foi observado que o estado desnaturado liga o zinco com pouca afinidade, ao contrário dos estados *folded* que ligam o zinco com grande afinidade [42]. Contudo a remoção do íon zinco destabiliza a estrutura da SOD1 e causa a distorção da interface do dímero, *unfolding* parcial do *loop* e aumento da

acessibilidade do íon cobre pelo solvente. Consequentemente há a formação de diferentes conformémeros com uma elevada propensão para a agregação a pH fisiológico [37]. A adição do zinco e a formação da ligação dissulfídrica alteram o equilíbrio de *folding* da SOD1, favorecendo a formação de espécies diméricas. Este estudo conclui que apenas a forma mais imatura da SOD1, isto é, sem nenhuma modificação pós-traducional favorece o estado monomérico em condições fisiológicas [3, 43].

Foi comprovado também que a coordenação do zinco é responsável pela pré-organização do sítio de ligação do cobre para ligar devidamente o cobre [37] e que o sítio de ligação do cobre consegue manter a estrutura organizada, mesmo na ausência do cobre [44]. Contudo o íon zinco apesar de ter uma elevada afinidade para o seu centro ativo também se consegue ligar ao sítio do cobre [37]. Esta metalação errada da proteína também poderá despoletar a deposição tóxica da SOD1.

Cobre

O cobre é necessário para a função enzimática da proteína. Observa-se que quando há deficiência de cobre no organismo existe uma concentração mais baixa de SOD1 e quando há um excesso de cobre na célula há uma sobre-expressão da SOD1. Podendo-se concluir que existe uma ligação entre a produção de SOD1 e a homeostasia do cobre [45-47].

O mecanismo de aquisição do zinco, *in vivo* ainda não é conhecido, mas o cobre é inserido pelo metalochaperão CCS (*copper chaperone for SOD*), seguindo-se da formação de uma ligação dissulfídrica em cada monómero. Estudos indicam que é necessário a ligação do íon zinco primeiramente ao estado monomérico reduzido da proteína, para o CCS interagir com a SOD1. Há a formação de um heterotetrâmero entre a SOD1 e o CCS para transferir o íon cobre seguindo-se a oxidação da ligação dissulfídrica de cada subunidade [3, 38, 42-43, 48-50]. O sítio de ligação do cobre apresenta uma conformação semelhante, na presença ou na ausência do íon cobre, sugerindo que o sítio de ligação do cobre é organizado antes da ligação do íon, provavelmente através da ligação do íon de zinco [37, 44].

Existem várias teorias que implicam uma química aberrante do cobre como causa da ELA. A formação de outros estados redox do cobre, como a formação do íon Cu^{1+} pode provocar mutações no gene da SOD1 e pode levar ao dano oxidativo das células. Observa-se que a administração de quelantes de cobre tem efeitos protetivos da doença em modelos de murghinhos [38, 51-52].

Ligação dissulfídrica

A ligação dissulfídrica intramolecular entre a cisteína 57 e 146 liga covalentemente o *loop* de ligação do zinco com a folha β do C terminal, $\beta 8$, perto da interface dimérica. A ligação dissulfídrica afeta apenas marginalmente o processo de *folding* do monómero, mas é crucial para a sua estabilidade e para a dimerização na ausência dos metais que estabiliza a estrutura dimérica [38].

As ligações dissulfídricas na SOD1 são mantidas oxidadas para assegurar a estabilidade do dímero e integridade da interface dimérica. A redução da ligação dissulfídrica altera o equilíbrio do *folding* favorecendo a formação de monómeros marginalmente *folded* e resulta no aumento de flexibilidade do *loop* Glu49-Asn53 que rompe a formação do dímero. Os mutantes da SOD1 associados à ELA são mais suscetíveis de ter a ligação dissulfídrica reduzida. [53]. Porém a redução da ligação dissulfídrica não afeta a termoestabilidade do monómero, tão significativamente como a perda dos íons metálicos [33].

1.2.4. Mutações na SOD1 associadas à ELA

Encontram-se descritas mais de 120 mutações diferentes no gene *sod1* associadas à ELA familiar (Figura 1.14). A maior parte destas mutações são substituições de aminoácidos, em pelo menos 64 resíduos diferentes, mas também existem deleções e inserções, entre outras. Estas mutações têm efeitos diversos e inesperados na estrutura, atividade e estabilidade do estado nativo da SOD1, muitas delas afetam a função da SOD1 diferencialmente e ainda não é conhecido nenhum fator comum a todas as mutações [29]. Como exemplo, mutações causadas por substituição de aminoácidos perto da zona de ligação dos íons metálicos ou nos resíduos do *loop* eletrostático poderão afetar a afinidade para a ligação dos íons metálicos ou a atividade enzimática. Porém mutações nos resíduos que formam a ligação dissulfídrica ou perto da interface das subunidades poderão influenciar a estabilidade da proteína e a sua estrutura [29, 54].

Foram realizados estudos em que retiraram o gene *sod1* de murganhos (*knockout*) e observou-se que não há neurodegeneração, podendo concluir que a doença é causada por ganho de toxicidade das mutações associadas à SOD1 e não por perda de função. Pensa-se que este ganho de função causa um aumento da propensão para a agregação, através de interações SOD1-SOD1 ou através de interações entre a SOD1 e outras proteínas. Para suportar esta hipótese de agregação observou-se que as variantes da SOD1 agregam mais rapidamente que a proteína *wild type* [55]. Observa-se também que a SOD1 patogénica de culturas de células e da espinal medula de murganhos transgênicos tendem a ser deficientes em metais e/ou na ligação dissulfídrica, levantando a possibilidade das mutações que causam a doença aumentarem os níveis de intermediários da SOD1 por impedimento a maturação da SOD1 mediada pelo CCS.

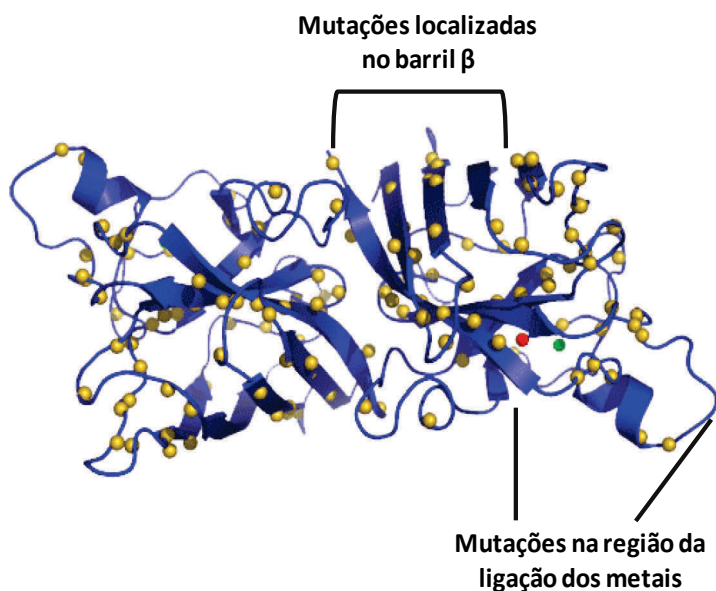


Figura 1.14: Representação esquemática da SOD1 com diferentes mutações associadas à ELA. As mutações estão representadas a amarelo. Adaptado de [56].

Existem duas categorias de mutações na SOD1, baseadas na sua localização e na estrutura: mutações localizadas no barril β e mutações localizadas na região de ligação dos metais. As mutações localizadas no barril β , normalmente têm uma estrutura tridimensional semelhante à forma *wild type*, contêm os cofatores metálicos e a sua estabilidade não é substancialmente alterada, enquanto que as mutações nas regiões de ligação dos íons

metálicos tendem a ser deficientes em iões metálicos e a apresentarem os *loops* electrostático e o de zinco com elevados níveis de desordem [57]. Quando comparada a estabilidade deste tipo de mutações com a forma *wild type* com metais observa-se uma estabilidade equivalente e em alguns casos até há um aumento da estabilidade térmica, apenas na forma desmetalada é que se observa, em alguns casos, uma diminuição da estabilidade dos mutantes.

1.2.4.1. A mutação SOD1-G37R

A substituição da glicina para arginina no resíduo 37 da SOD1 é uma das mutações mais frequentes, associada à ELA familiar. Esta mutação não causa um rearranjo significativo na cadeia principal, visto que não está na vizinhança do sítio de ligação dos metais nem na interface dimérica, mas sim no barril β . Contudo a conservação da glicina é importante para a conservação da cadeia polipeptídica principal e para favorecer as interações hidrofóbicas que promovem o empacotamento da proteína [57].

O mutante G37R exhibe as seguintes características: (i) retém a atividade específica; (ii) não tem uma redução da estabilidade polipeptídica relativamente à forma *wild type*; (iii) os murganhos que expressam a proteína humana SOD1-G37R têm uma expressão do mutante 4-12 vezes superior ao *wild type* e (iv) quando está completamente metalada a estabilidade, estrutura e mobilidade da proteína é semelhante à forma *wild type*, porém quando está sem metais há uma alteração da estrutura que faz com que o mutante seja menos estável [57-58].

Na estrutura de raio-X deste mutante observou-se que os dois monómeros têm ambientes diferentes e que a sua estrutura é diferente perto do sítio de ligação do cobre. Uma das subunidades é coordenada por quatro ligandos para o ião cobre e a outra subunidade tem apenas três ligandos a coordenar o ião cobre. Uma possível explicação é a presença do ião cobre com diferentes estados de oxidação em cada monómero [57].

1.2.5. O monómero mSOD1 como precursor para a agregação e modelo de estudo

A SOD1 na forma monomérica foi detetada em modelos de murganhos [59] e em sistemas *in vivo* de eritrócitos [60]. Para detetar a forma monomérica, Liu *et al.* utilizou um anticorpo específico que se liga à interface do dímero quando esta está exposta (SEDI - *SOD1 exposed dimer interface*) e observou que a interface do dímero é anormalmente exposta em mutantes SOD1 de murganhos transgênicos [61]. Após estas descobertas surgiu a hipótese de que o monómero da SOD1 poderia ser o precursor para a agregação da SOD1. Está irá ser a hipótese de estudo deste trabalho de investigação (Figura 1.15).

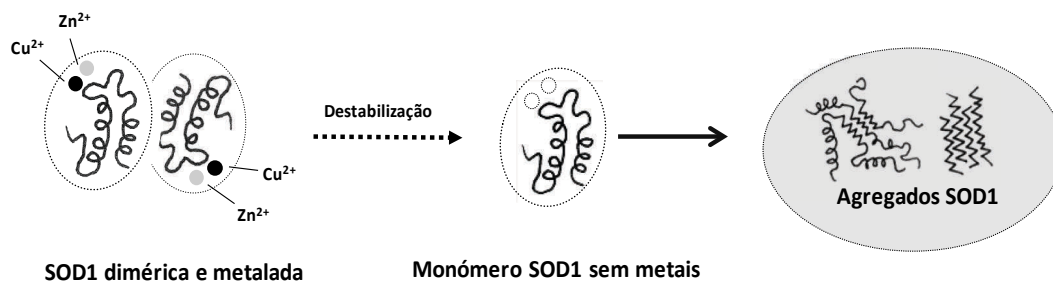


Figura 1.15: Esquema representativo da hipótese de agregação da SOD1, com a forma monomérica como precursor da agregação.

Para suportar esta hipótese um estudo recente e inovador provou que a SOD1 sem metais (apoSOD1) para fibrilar sob condições fisiológicas necessita de pequenas quantidades

de apoSOD1 com ligações dissulfídica reduzidas para iniciarem rapidamente a fibrilação, e é conhecido que em condições redutoras a população da SOD1 é principalmente monomérica. Uma vez iniciada a fibrilação, a elongação pode ser prosseguida pelo recrutamento de apoSOD1 ou de SOD1 parcialmente metalada, na forma monomérica [41].

Uma das razões para a elevada propensão para a agregação da forma monomérica sem metais poderá ser a dinâmica de *unfolding* local. Com a remoção dos metais, os *loops* IV e VII ganham mobilidade dinâmica e tornam-se mais flexíveis. Esta dinâmica local pode ser o *core* para a agregação devido à exposição do núcleo hidrofóbico [33, 62-63]. Comparando o monómero na forma *wild type* com o mutante G37R, também na forma monomérica se observou que o *unfolding* local está localizado em segmentos de péptidos diferentes o que pode provocar diferentes morfologias dos agregados. Através de TEM (Microscopia de transmissão eletrônica) observou-se que os agregados do mutante G37R têm uma morfologia mais desordenada e fina, comparada com as fibras da forma *wild type* [63].

Para se estudar a importância da forma monomérica no mecanismo de agregação da SOD1 foi construído um mutante da SOD1, com a substituição dos resíduos hidrofóbicos F50 e G51 para resíduos hidrofílicos, localizados na interface do dímero para produzir espécies monoméricas (Figura 1.16). Estas substituições remodelam e expõem a interface dimérica ao solvente [64].

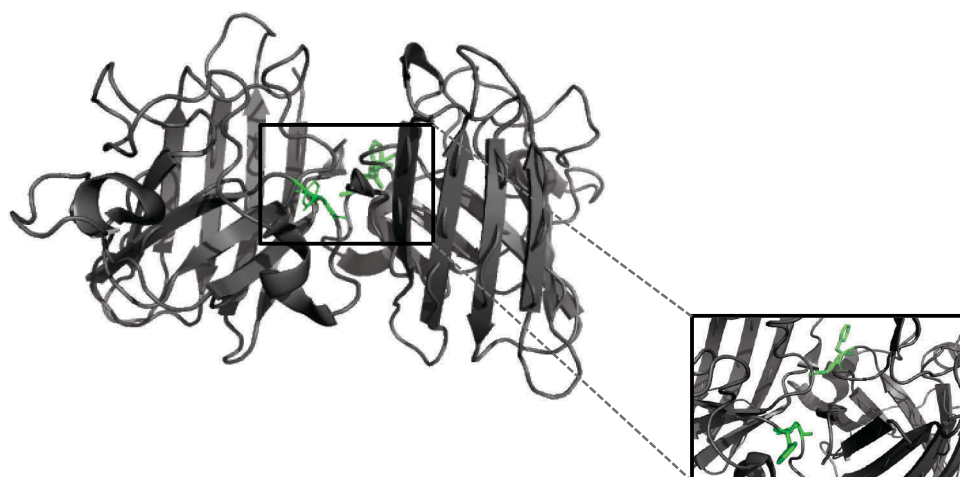


Figura 1.16: Estrutura tridimensional da SOD1 (PDB ID: 1SPD) com resíduos F50 e G51 assinalados a verde em cada monómero. Os resíduos F50 e G51 situam-se na interface dimérica. Estes resíduos foram mutados para não permitir a interação entre os monómeros. A estrutura foi obtida usando o programa *Pymol*.

O monómero sem metais tem uma estrutura terciária bem definida, porém as duas folhas β que contêm dois ligandos do cobre e um ligando do zinco são mais pequenos e a conformação da proteína é menos compacta que o monómero com metais. A forma com metais e a forma sem cobre são muito semelhantes, mas diferem da forma apo, sugerindo que o zinco tem um papel relevante na determinação do *folding* e no desenvolvimento da estrutura secundária [44, 65].

1.2.6. Alterações metabólicas associadas à ELA

Muitas doenças neurodegenerativas têm como característica perturbações nos metabolitos, pequenas moléculas presentes nas células, tecidos ou outras amostras biológicas. Existem vários estudos para deteção destas pequenas moléculas para entender as alterações globais e o estado fisiológico das vias afetadas pela doença. Estes metabolitos são ótimos marcadores da doença para deteção precoce e para potenciais tratamentos [66] e existe a possibilidade destas pequenas moléculas terem um papel na estabilização e agregação de proteínas. Contudo ainda não existem estudos de estabilidade nem de agregação que fortaleçam uma relação entre a alteração da concentração destes metabolitos e a destabilização da proteínas e formação de agregados proteicos.

Baseado na hipótese de agregação existe uma grande procura de agentes que estimulem a maturação das formas nativas e também agentes que inibam a oligomerização da SOD1. A estabilização das proteínas foi demonstrado como opção de tratamento para outras doenças neurodegenerativas. Observou-se, por exemplo, que a administração oral de trealose em murganhos transgênicos do modelo da doença de Huntington diminui os agregados proteicos formados [67]. Em modelos de murganhos que expressam o mutante SOD1-G93A, a administração de trealose resulta num pequeno efeito inibidor no início e duração da doença [38].

Vários estudos observaram alterações metabólicas no cérebro de pacientes com ELA. Estes estudos utilizam várias técnicas de metabolómica, tais como a espectroscopia de ressonância magnética de prótons (¹H-MRS) e cromatografia gasosa associada à espectroscopia de massa (GC-TOFMS) para providenciar marcadores para a deteção da doença em fases iniciais. Observou-se uma alteração do perfil metabólico, no caso de pacientes que expressavam mutantes associados à ELA, o fluido cérebro-espinhal e a medula espinhal são as regiões mais estudadas, porque são os locais mais afetados pela morte dos neurónios motores na ELA [68-69].

Vários estudos reportam alterações nos níveis de metabolitos em pacientes com ELA [69-71]. No caso do mutante D90A os metabolitos que contribuem mais para a alteração do perfil metabolómico são arginina, lisina, ornitina, serina, treonina e ácido piroglutâmico e todos foram encontrados com concentrações menores que na forma *wild type*, porém existem muitos mais que também contribuem para esta alteração metabolómica [69].

1.3. Métodos de análise estrutural e de estabilidade proteica

Nesta secção irá abordar-se brevemente métodos para a deteção da estabilidade proteica, térmica e química, bem como métodos biofísicos para a análise da estrutura e de estabilidade da proteína. Esses métodos biofísicos incluem o dicroísmo circular, a espectroscopia de fluorescência e o varrimento diferencial de fluorescência.

1.3.1. Deteção da estabilidade proteica (térmica e química)

O estado nativo adota em solução uma conformação única e muito ordenada, em contraste com o estado desnaturado que é conformacionalmente heterogéneo e normalmente sem estrutura. A desnaturação proteica consiste na passagem do estado nativo para uma conformação desnaturada. Entre estes dois estados existe um ponto médio de transição, definido por temperatura de desnaturação térmica (T_m), nas desnaturações térmicas; ou concentração de desnaturação química (C_m), nas desnaturações químicas. Este ponto médio de transição entre os dois estados corresponde à desnaturação de 50% das proteínas (Figura 1.17) [5]. Durante a desnaturação a proteína sofre alterações conformacionais que podem ser monitorizadas. Nas seguintes secções serão descritas técnicas usadas no trabalho de investigação para monitorizar a conformação e estabilidade das proteínas.

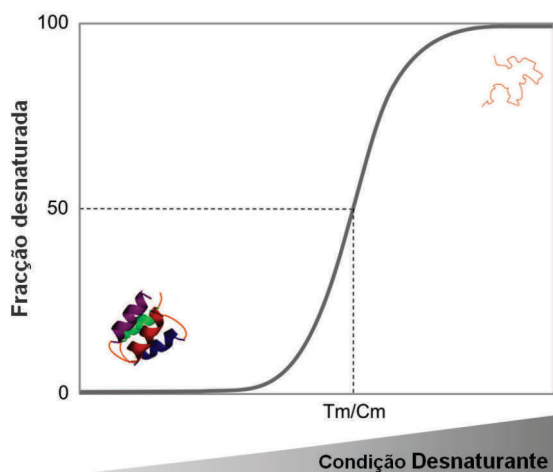


Figura 1.17: Representação de uma curva de desnaturação. A representação esquemática da proteína representa a forma nativa (quando a fração desnaturada é zero) e a forma desnaturada (quando a fração desnaturada é 100)

Para medir a estabilidade conformacional da proteína é necessário determinar a constante de equilíbrio e a diferença entre a energia livre, ΔG , da seguinte reação:



A estabilidade conformacional é frequentemente denominada $\Delta G(H_2O)$ a 25°C, onde H_2O representa a ausência de desnaturante. Existem várias técnicas utilizadas para monitorizar a desnaturação de uma proteína, contudo a espectroscopia de UV, fluorescência e espectroscopia de dicroísmo circular são as mais usadas.

A escolha da técnica depende de vários fatores que irão determinar qual o melhor sistema a utilizar. Deverão ser considerados três fatores importantes: (i) a magnitude da resposta. Diferentes técnicas necessitam de diferentes quantidades de proteína, que é um fator decisivo na escolha de uma técnica; (ii) é necessário escolher uma técnica onde seja possível

observar alterações nas características entre a forma nativa e a forma desnaturada e (iii) é importante ter em conta a razão sinal-ruído. Quanto maior for o valor da razão mais sensível será a técnica.

Estudar a estabilidade conformacional de uma proteína implica medições termodinâmicas. A maior parte das proteínas tem uma desnaturação constituída por um mecanismo de *folding* de dois estados. Onde a forma nativa dá origem à forma desnaturada (Equação 4). Contudo o mecanismo do *folding* pode necessitar da formação de intermediários para originar a forma nativa. De seguida irei assumir um mecanismo de dois estados, para facilitar a discussão.

Para uma determinada temperatura a fração de moléculas na forma nativa (f_N) em conjunto com a fracção de moléculas na forma desnaturada (f_D) formam o total de moléculas em solução:

$$f_N + f_D = 1 \quad (\text{Equação 5})$$

Logo, o valor observado em qualquer ponto (y) é:

$$y = y_N f_N + y_D f_D \quad (\text{Equação 6})$$

Onde y_N e y_D representam os valores característicos dos estados nativo e desnaturado, respetivamente. Igualando as duas equações:

$$f_D = \frac{y_N - y}{y_D - y} \quad (\text{Equação 7})$$

A constante de equilíbrio, K , e a diferença entre a energia livre, ΔG , podem ser calculadas a partir de:

$$K = \frac{f_D}{1 - f_D} = \frac{f_D}{f_N} = \frac{y_N - y}{y - y_D} \quad (\text{Equação 8})$$

$$\Delta G = -RT \ln K = -RT \ln \frac{y_N - y}{y - y_D} \quad (\text{Equação 9})$$

Onde R é a constante dos gases e T a temperatura absoluta. É de notar que os valores f_N e f_D são obtidos por extrapolação das regiões de pré e pós transição.

A análise das curvas de desnaturação necessita da medição do ΔG na gama de temperaturas que ocorre a desnaturação. O método usado para obter a variação da entalpia é a equação de van't Hoff:

$$\frac{d(\ln K)}{d(1/T)} = -\frac{\Delta H}{R} \quad (\text{Equação 10})$$

A entalpia varia com a temperatura do desnaturante, o que é esperado quando a capacidade calorífica dos produtos e dos reagentes difere:

$$\frac{d(\Delta H)}{d(T)} = C_p(U) - C_p(F) = \Delta C_p \quad (\text{Equação 11})$$

Para calcular ΔG em função da temperatura, é necessário calcular ΔH e ΔC_p . A temperatura de desnaturação térmica (T_m) é calculada quando $\Delta G(T_m)=0$. Com estes parâmetros é possível calcular ΔG a qualquer temperatura:

$$\Delta G(T) = \Delta H_m(1 - T/T_m) - \Delta C_p [(T_m - T) + T \ln(T/T_m)] \quad (\text{Equação 12})$$

1.3.2. Métodos Biofísicos

1.3.2.1. Espectroscopia de Dicroísmo Circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é um dos métodos que permite avaliar a conformação das proteínas e ácidos nucleicos, analisar a termodinâmica e cinética do *folding* e desnaturação de biomoléculas e estudar a interação entre biomoléculas, como proteína-proteína ou proteína-ligando. Esta técnica baseia-se na interação de um feixe de luz polarizada circular com moléculas quirais, essencialmente cadeias laterais de aminoácidos aromáticos e ligações dissulfídicas [72].

As proteínas no estado nativo apresentam um espectro de CD característico e específico. Contudo quando as proteínas sofrem alterações conformacionais há alterações do espectro de CD, que providenciam novas informações sobre a estrutura da proteína. Por este método é possível monitorizar com elevada sensibilidade alterações na estrutura secundária e terciária, dependendo da gama de comprimento de onda utilizada. Na zona do UV distante, entre 190 e 250 nm, é possível estimar elementos de estrutura secundária. O espectro do CD tem formas distintas, dependendo da predominância do tipo de estrutura secundária apresentada na amostra da proteína. As hélices α têm um pico negativo característico a 222 e 208 nm e as folhas β têm um pico negativo entre 217-220 nm (Figura 1.18)

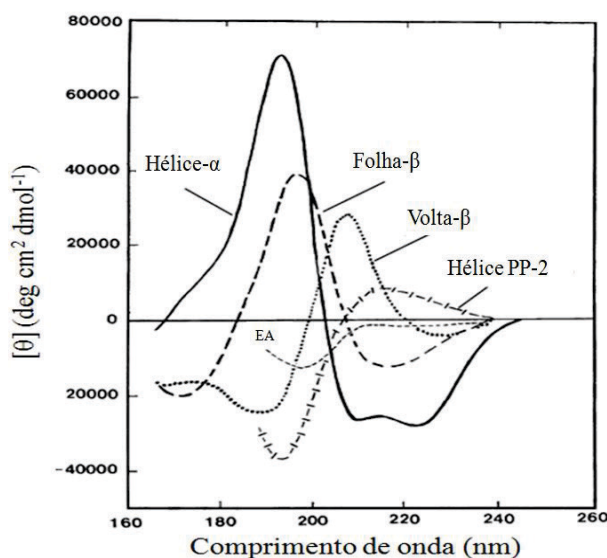


Figura 1.18: Espectros representativos das diferentes estruturas secundárias detetadas por Dicroísmo Circular de UV distante. EA: Enrolamento Aleatório.

No UV próximo é possível observar alterações na estrutura terciária [73]. O sinal do CD na região entre 255 nm e 270 nm está associado à presença de grupos fenil e à fenilalanina. A tirosina tem um sinal característico na região entre 285 nm e 305 nm.

A espectroscopia de CD tem variadas aplicações. Além de estudar a conformação das proteínas é possível estudar a estabilidade da proteína, através de alterações do espectro à medida que se alteram as condições do meio, tais como, a temperatura, concentração de desnaturante e pH [73].

1.3.2.2. Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência permite estudar o *folding* e dinâmica das proteínas, através da análise da estrutura terciária das proteínas. Esta análise baseia-se na variação da intensidade e comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência intrínseca das proteínas, que é proveniente dos resíduos aromáticos, como a fenilalanina, tirosina e triptofano [74-75].

O triptofano é o resíduo que mais contribui para o sinal, visto ser o resíduo que tem maior absorvância de comprimento de onda de excitação (280 nm) e um maior rendimento quântico de emissão a um comprimento de onda de emissão que varia entre 300 e 350 nm, dependendo da polaridade do solvente. Quando existe um desvio do comprimento de onda de emissão para valores superiores existe um aumento da exposição dos aminoácidos aromáticos [75].

Para além da fluorescência intrínseca é ainda possível recorrer a fluoróforos extrínsecos, tais como o 1,8-ANS, *Sypro Orange* para estudos de estabilidade e conformação proteica e Tioflavina T (ThT) para estudos cinéticos de agregação. No caso particular do 1,8-ANS e do *Sypro Orange* há um aumento substancial de intensidade quando estão ligados a regiões hidrofóbicas das proteínas, as quais se tornam expostas aquando da desnaturação ou quando há uma população de intermediários do *folding*, como os *molten globule*. A ligação do 1,8-ANS é acompanhada com um desvio de emissão máxima de aproximadamente 530 nm para 480 nm. O ThT é um fluoróforo usado para detetar a presença de agregados, principalmente fibras amilóides. A ligação a agregados induz um desvio no comprimento de onda máximo de 482 nm para 478 nm [75-76].

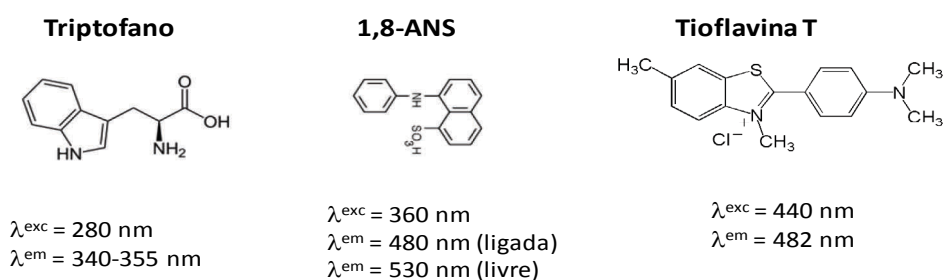


Figura 1.19: Estrutura química do triptofano, ANS e Tioflavina T e respetivos comprimentos de onda de excitação e emissão.

1.3.2.3. Varrimento Diferencial de Fluorescência (DSF)

A técnica de varrimento diferencial de fluorescência (DSF, do inglês *differential scanning fluorimetry*) é uma técnica de fluorescência extrínseca, com a utilização de fluoróforos, como o *Sypro Orange*, com afinidade para regiões hidrofóbicas das proteínas, que ficam expostas com a desnaturação térmica [77].

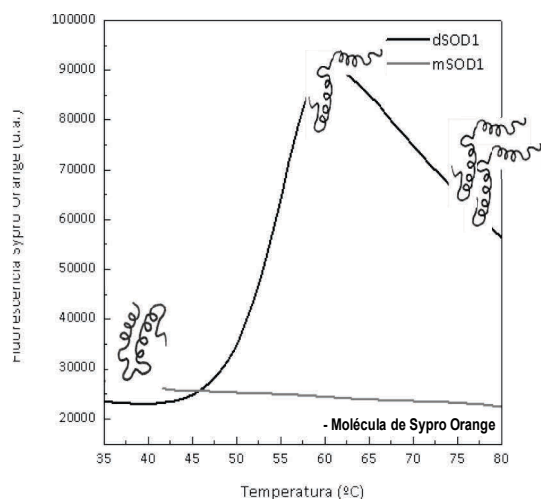


Figura 1.20: Esquema representativo da técnica de DSF. A fluorescência do *Sypro Orange* aumenta drasticamente quando se encontra ligado a zonas hidrofóbicas expostas após a desnaturação de uma proteína. É possível estudar a estabilidade de uma proteína (por exemplo, a temperatura de desnaturação) seguindo a variação da intensidade de fluorescência à medida que se aumenta a temperatura

Há um aumento de emissão de fluorescência do fluoróforo quando este se associa a regiões hidrofóbicas da proteína. Este aumento significativo de emissão de fluorescência é facilmente detetado, permitindo estudar rapidamente a desnaturação proteica em função da temperatura, e avaliar a estabilidade proteica (Figura 1.20). Este método, também designado comercialmente por *Thermofluor*, pode ser realizado num instrumento de PCR em tempo real onde se podem obter curvas de desnaturação térmica de uma forma rápida (~1h) para um grande número de amostras (placas de 96 poços), requerendo pequenas quantidades de proteína (1-15 µg por poço) [77-78].

Existem outras técnicas que fornecem informação sobre a estrutura secundária e terciária de uma proteína, tais como, a espectroscopia vibracional de infravermelho (FTIR) [79], Raman [80] e EPR [81]. A cristalografia de raio-X e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear permitem uma determinação de alta resolução, ao nível atómico, da estrutura tridimensional e dinâmica das proteínas [82].

A agregação proteica pode ser monitorizada por estudos cinéticos, estudos computacionais e por visualização dos produtos da agregação. Os estudos cinéticos são utilizados para entender o mecanismo da agregação e para identificar os fatores principais que ativam a via de agregação. Podem ser monitorizados por vários métodos, tais como, absorvância, fluorescência com fluoróforos extrínsecos, tais como a Tioflavina T ou *Congo Red* ou por DLS (*dynamic light scattering*). Para observar que tipos de agregados são formados pode-se utilizar técnicas óticas, tais como TEM e por *dot blots* com anticorpos conformacionais [83].

1.3.3. Anti-corpos conformacionais

Investigar o papel dos agregados na patogénese das doenças neurodegenerativas apresenta o problema na distinção do tipo de agregado formado. Para solucionar este problema, recentemente Kayed *et al.* produziu dois anti-corpos conformacionais. Estes anti-corpos foram produzidos com base nas características estruturais de conformações que diferem das outras existentes em solução. Esta detecção é realizada através do reconhecimento de epítipo genérico na cadeia principal polipeptídica das proteínas envolvidas no agregado que é distinta de outros agregados. Contudo é independente da sequência de aminoácidos [84].

O anti-corpo OC (anti-fibras amilóides) reconhece especificamente um epítipo comum à maior parte de fibras amilóides e oligómeros fibrilares. O anti-corpo A11 (anti-oligómeros amilóides) reconhece especificamente um epítipo comum à maior parte dos oligómeros amilóides [85].

Um método rápido para a detecção do tipo de agregados com o auxílio destes anti-corpos é o *dot blot*. Através desta técnica é possível identificar e quantificar o tipo de agregado formado. É semelhante à técnica de *western blot*, mas as amostras não são separadas electrofóreticamente. Há a deposição da amostra diretamente numa membrana e incubação com o anticorpo. A figura 1.21 demonstra um exemplo de aplicação dos anticorpos conformacionais: anti-corpo A11 e anti-corpo OC e demonstra que estes anticorpos reconhecem um epítipo genérico, reagindo igualmente com diferentes proteínas [85].

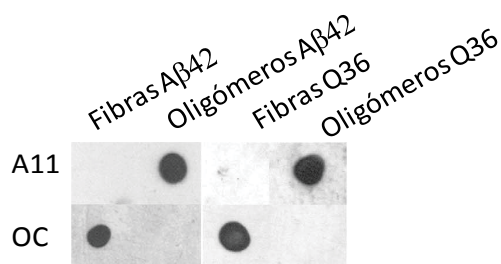


Figura 1.21: Análise de fibras e oligómeros de Aβ42 e Q36 por *Dot blot*. As fibras Aβ42 e Q36 apenas reagem com o anti-corpo OC e os oligómeros Aβ42 e Q36 apenas reagem com o anti-corpo A11 [85].

Objetivo do trabalho

O objetivo principal da tese foi o de caracterizar a estabilidade da forma monomérica da SOD1 e a sua propensão para a formação de agregados. Como modelo de estudo recorreu-se a uma forma mutada da SOD1, no qual os resíduos envolvidos em contactos inter-subunidades foram alterados (SOD1-F50E/G51E), o que impede a dimerização da proteína. Realizou-se um estudo comparativo entre as formas monoméricas e diméricas, para observar diferenças na estabilidade e na propensão para agregar. Paralelamente realizou-se também um estudo comparativo entre a forma monomérica SOD1 *wild type* (mSOD1) e a variante (mSOD1-G37R), que reproduz uma mutação associada à ELA, visando comparar as alterações estruturais e de estabilidade, assim como o efeito dos iões metálicos (Zn^{2+} e Cu^{2+}).

Uma outra vertente do trabalho visou o estudo da influência de pequenas moléculas na estabilidade e agregação da SOD1. O estudo envolveu 15 metabolitos recentemente identificadas como estando presentes no fluído cerebrospinal de pacientes com ELA, em concentrações alteradas.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Expressão e purificação proteica

2.1.1. Expressão e purificação da hSOD1 wt, dímero

A expressão e purificação da hSOD1, na forma dimérica, foi realizada como descrito em [86]. Para obter a sobre-expressão das proteínas foi realizada uma transformação de células BL21(DE3) Gold de *Escherichia coli* (GE Healthcare) com 1 μ L de plasmídeo pACA fornecido por Joan S. Valentine (UCLA, USA). Para induzir a entrada dos plasmídeos nas células foi realizado um tratamento de choque de temperatura, 30 minutos em gelo, seguindo-se de 45 segundos a 42°C e incubação em gelo durante 5 minutos. Adicionaram-se 900 μ L de meio TB (anexo I) e incubou-se a 37°C, a 150 rpm, durante 1h. De seguida, centrifugou-se a amostra, durante 1 minuto, ressuspendendo-se o *pellet* em 100 μ L de meio TB. As células transformadas cresceram em placas de meio LA (Anexo I) com 100 μ g/mL Ampicilina (AmershamBiosciences), durante a noite. No dia seguinte, selecionou-se uma colónia isolada e inoculou-se a mesma em 10 mL de meio TB com 100 μ g/mL de ampicilina, durante a noite, a 30°C e 150rpm. Procedendo-se no outro dia à transferência de 10mL de crescimento para 0,5L de meio TB com 100 μ g/mL de ampicilina.

As células foram crescidas em meio TB, suplementado com 100 μ L/mg de ampicilina, a 30°C e a 150 rpm, até atingir uma DO_{600nm} entre 0.5 e 0.8. Posteriormente foram depois induzidas com 0.5mM de IPTG, 3 mM $CuSO_4$ e 30 μ M $ZnSO_4$, e cresceram a 23°C, durante a noite.

As células foram recolhidas através de centrifugação (centrifuga Beckman Coulter Avanti J25I, com o rotor JA-10) a 8000rpm a 4°C, durante 10 minutos e ressuspendidas em Tris-HCl 50 mM pH 7.5, DNase (AppliChem), RNase (Stratagene) e 0.5mM de PMSF. Foram partidas através de célula pressurizada de French, seguindo-se uma centrifugação (rotor 25.5) a 12000rpm, a 4°C, durante 45 minutos. O sobrenadante foi incubado a 65°C, durante 30 minutos e, posteriormente, centrifugado a 10000rpm, durante 45 minutos. Realizou-se uma precipitação seletiva das proteínas presentes em solução, através da adição gradual de sulfato de amónio (Sigma-Aldrich). Primeiramente incubou-se a solução com 50% de sulfato de amónio, durante 2 horas, a 4°C e com agitação. Centrifugou-se a 10000rpm, durante 20 minutos e recolheu-se o sobrenadante. Realizou-se uma segunda precipitação, com 60% de sulfato de amónio, para remover mais proteínas contaminantes, durante 1 hora, nas mesmas condições e centrifugou-se, novamente a 10000rpm, durante 20 minutos. Para recolher a fração onde se encontrava a SOD1 realizou-se uma última precipitação com 90% de sulfato de amónio, durante 2 horas e recolheu-se o *pellet* após centrifugação a 10000rpm, durante 45 minutos. O *pellet* foi ressuspendido em 40 mL de tampão Tris-HCl 50mM a pH 7.5.

A fração que contém a SOD1 foi eluída numa coluna de exclusão molecular, Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare), com o tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.5, a um fluxo de 0.2 mL/min. Posteriormente foi realizada uma cromatografia de troca iónica, com as frações que continham SOD1, numa coluna Q Sepharose Fast-Flow (GE Healthcare). Utilizou-se como tampão 10 mM Tris-HCl pH 7.5, a um fluxo de 2 mL/min e um gradiente de NaCl de 0M até 1M. As frações que continham SOD1 eluíram, aproximadamente, a 140 mM de NaCl.

A pureza de todas as frações foi confirmada por SDS-PAGE a 12.5% (Anexo II). A concentração das frações com um maior grau de pureza foram determinadas pelo método de Bradford [87] e congeladas em azoto líquido e armazenadas a - 80°C.

2.1.2. Expressão e purificação de hSOD1-F50E/G51E e hSOD1-F50E/G51E/G37R

A forma monomérica da SOD1 foi estudada através do mutante hSOD1-F50E/G51E (mSOD1 *wt*), para formar a forma *wild type* do monómero e do mutante hSOD1-F50E/G51E/G37R (mSOD1-G37R) para formar a forma monomérica com um mutante associado à ELA.

Para obter a sobre-expressão da mSOD1 *wt* e da mSOD1-G37R foi realizada uma transformação de células BL21(DE3) Gold de *Escherichia coli* (GE Healthcare) com 1 µL de plasmídeos pET22b fornecidos por Joan S. Valentine (UCLA, USA). Para induzir a entrada dos plasmídeos nas células foi realizado um tratamento de choque de temperatura, 30 minutos em gelo, seguindo-se de 45 segundos a 42°C e incubação em gelo durante 5 minutos. Adicionaram-se 900 µL de meio TB (Anexo I) e incubou-se a 37°C, a 150 rpm, durante 1h. De seguida, centrifugou-se a amostra durante 1 minuto, ressuspensando-se o *pellet* em 100 µL de meio TB. As células transformadas cresceram em placas de meio LA (Anexo I) com 100µg/mL ampicilina (Amersham Biosciences), durante a noite. No dia seguinte, selecionou-se uma colónia isolada e inoculou-se a mesma em 40 mL de meio TB com 100µg/mL de ampicilina, durante a noite, a 37°C e 150rpm. Posteriormente no outro dia transferiram-se os 10mL de crescimento para 0,5L de meio TB com 100 µg/mL de ampicilina a 30°C e a 150 rpm, até atingir uma DO_{600nm} entre 0.6 e 0.8. As células foram depois induzidas com 0.5mM de IPTG, 1.5mM CuSO₄ e 200µM ZnSO₄, e cresceram a 20°C e 150rpm, durante a noite.

As células foram recolhidas através de centrifugação (centrifuga Beckman Coulter Avanti J25I, com o rotor JA-10) a 8000rpm a 4°C, durante 10 minutos e ressuspensas em 50mM Hepes pH 7.5; 150 mM NaCl e 10mM Imidazol, DNase e 0.5mM de PMSF. Foram partidas através de célula pressurizada de French, seguindo-se uma centrifugação (rotor 25.5) a 11000rpm, a 4°C, durante 30 minutos e uma ultracentrifugação (ultracentrifuga Beckman Coulter Optima LE-80, com o rotor 45-Ti) a 42000rpm, a 4°C, durante 45 minutos.

A fração solúvel foi sujeita a uma separação proteica por cromatografia de afinidade com uma coluna His-Trap HP de 5mL (GE Healthcare), equilibrada em 50mM Hepes pH 7.5; 150 mM NaCl e 10mM imidazol, a um fluxo de 2mL/min. As proteínas ligadas à coluna foram eluídas através de um gradiente de 10-500mM de imidazol. A mSOD1 foi eluída aproximadamente com 150mM de imidazol.

Para a remoção da cauda de Histidinas foi realizada uma hidrólise com a protease TEV, na presença de 3mM glutatona; 0.3mM glutatona oxidada, 5 mM citrato, 200 mM cloreto de sódio, 10 µM cloreto de zinco e 20 mM Tris-HCl pH7.6, à temperatura ambiente, com uma proporção de 1 molécula de TEV para 40 moléculas de SOD1. Posteriormente a mistura que continha a SOD1 e a TEV foi eluída novamente na coluna HisTrap HP onde a SOD1 foi eluída na ausência de imidazol e a TEV que continha também uma cauda de histidina ficou agarrada à coluna. Para confirmar a hidrólise foi realizado um Western Blot na presença de um anticorpo anti-Histag (GE Healthcare) e com uma membrana de nitrocelulose.

A pureza de todas as frações foi confirmada por SDS-PAGE a 12.5% (Anexo II). A concentração das frações com um maior grau de pureza foram determinadas pelo método de Bradford [87] e congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C.

2.1.3. Expressão e purificação da TEV protease

Para obter a sobreexpressão da proteína foi realizada uma transformação de células BL21(DE3) Gold de *Escherichia coli* (GE Healthcare) com 1 µL de plasmídeo His6-Thr-TEV

protease. Para induzir a entrada dos plasmídeos nas células foi realizado um tratamento de choque de temperatura, 30 minutos em gelo, seguindo-se de 45 segundos a 42°C e incubação em gelo durante 5 minutos. Adicionaram-se 900 µL de meio TB (Anexo I) e incubou-se a 37°C, a 150 rpm, durante 1h. De seguida, centrifugou-se a amostra, durante 1 minuto, ressuspensando-se o *pellet* em 100 µL de meio TB. As células transformadas cresceram em placas de meio LA (Anexo I), durante a noite, com 30µg/mL canamicina (*AmershamBiosciences*). No dia seguinte, selecionou-se uma colónia isolada e inoculou-se a mesma em 10 mL de meio TB com 30µg/mL de canamicina, durante 4 horas. Posteriormente inoculou-se 130 mL do meio TB com 30µg/mL de canamicina e 0.5mL das células, durante a noite, a 37°C e 150rpm. No dia seguinte, transferiram-se 25mL de crescimento para 0,5L de meio TB com 30 µg/mL de canamicina e 1% de D-glucose, as células cresceram a 37°C e a 150 rpm até atingir uma DO_{600nm} de 0.5. As células foram depois induzidas com 0.5mM de IPTG, e cresceram a 30°C, durante 4 horas.

As células foram recolhidas através de centrifugação (centrifuga *Beckman Coulter Avanti J25I*, com o rotor JA-10) a 8000rpm a 4°C, durante 10 minutos e ressuspensas em 20mM Tris-HCl pH8; 200mM NaCl; 10 mM Imidazol e 0.2% trinton X-100; DNase, lisozima e 0.5mM de PMSF. Foram partidas através de célula pressurizada de *French*, seguindo-se uma centrifugação (rotor 25.5) a 18000rpm, a 4°C, durante 30 minutos e uma ultracentrifugação (ultracentrifuga *Beckman Coulter Optima LE-80*, com o rotor 45-Ti) a 42000rpm, a 4°C, durante 45 minutos.

A fração solúvel foi sujeita a separação proteica por cromatografia de afinidade com uma coluna *His-Trap HP* de 5mL (*GE Healthcare*), equilibrada em 20 mM Tris-HCl pH8; 200 mM NaCl; 120 mM Imidazol e 2mM β-Mercaptoetanol. Para eluir proteínas ligadas inespecificamente à coluna aumentou-se a força iónica da coluna, com 1M de NaCl. As proteínas que ficaram ligadas à coluna foram eluídas através de um gradiente de 10-300 mM de imidazol. As frações que continham TEV protease eluíram, aproximadamente, com 90mM de imidazol.

A pureza de todas as frações foi confirmada por SDS-PAGE a 12.5% (Anexo II). A concentração das frações com um maior grau de pureza foram determinadas pelo método de Bradford [87] e congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C.

2.2. Quantificação de metais pelo método de Zincon

Para determinar a quantidade de zinco e cobre presente na SOD1 foi realizado o método do Zincon [88]. Este método baseia-se no poder quelante seletivo do composto Zincon. Primeiramente foi necessário realizar uma reta de calibração de ZnSO₄, com 8 pontos, entre 0M e 25 µM. Todas as soluções continham 25 µL de 1.6mM Zincon e 950µL de 8.42M ureia em ácido bórico a pH 9.0. O Zincon foi o último reagente a ser adicionado. As soluções foram incubadas à temperatura ambiente durante 5 minutos e foi lida a absorvância a 620nm.

Primeiramente foi quantificada a quantidade total de metais na proteína, pois o Zincon quela os dois metais. Foi preparada uma solução com 5µM de proteína, acidificada com 0.2M de HCl para facilitar a libertação dos metais no interior da proteína, e posteriormente foi adicionado 8.42M de ureia em ácido bórico a pH9.0 e incubado durante 15-30 minutos. De seguida foi adicionado 25µL de 1.6mM de Zincon à solução, a solução foi misturada e incubada novamente durante 15-30 minutos. Após a incubação foi lida a absorvância a 620 nm.

Para quantificar a quantidade de cobre na solução foi adicionado 5µL de 100mM de EDTA, para quelar todo o zinco existente na solução. A amostra foi incubada durante 15 minutos e foi lida a absorvância a 620 nm. A quantidade de zinco existente na solução foi calculada através da diferença entre a quantidade total de íons metálicos em solução e a quantidade de cobre existente.

2.3. Atividade enzimática

Determinou-se a atividade enzimática das diferentes formas da SOD1 – dSOD1, mSOD1 wt e mSOD1-G37R, segundo o protocolo de Mc Cord e Fridovich [89].

O método baseia-se na reação redox entre a Xantina oxidase e o Citocromo c. Adiciona-se numa cuvette com agitação, 50 mM de tampão fosfato, 100µM EDTA, 10µM de Citocromo c e 50µM de xantina. Após a estabilização do sinal foi adicionada Xantina oxidase para se formar a forma reduzida do citocromo c a 550 nm.

É de referir que a quantidade de xantina oxidase adicionada foi a necessária para obter uma taxa de formação de 0,0025 ΔAbs/min. Após a estabilização da taxa de formação de citocromo c reduzido, foi adicionado um determinado volume de amostra de SOD1 para inibir a formação da forma reduzida do citocromo c, variável consoante a amostra.

2.4. Métodos de obtenção do estado Apo da SOD1

Para obter a proteína sem metais foram realizados dois métodos: (i) num dos métodos foi realizada uma diálise com 50 mM tampão acetato e 10 mM EDTA a pH 3.8, para libertar os metais do interior da proteína e capturá-los através do EDTA. De seguida realizou-se uma diálise com tampão 10 mM MES a pH 7 e 10 mM EDTA para a proteína obter a estrutura, na presença de água chelex e posteriormente uma diálise com tampão 10 mM MES a pH 7 [90]; (ii) no outro método utilizou-se 4 M de guanidínio para realizar o *unfolding* da SOD1 na presença de 50 mM EDTA e posterior renaturação através de diálise gradual com 10 mM MES a pH 7 [53].

2.5. Método de análise da estrutura secundária e estabilidade

Para monitorizar as alterações na estrutura secundária das proteínas foram traçados espectros de dicroísmo circular na região UV-distante, entre 200 e 260nm, num espectropolarímetro *Jasco J-815*, controlado termostaticamente com um dispositivo *Peltier*. A desnaturação térmica foi monitorizada através das alterações do sinal a 230nm e a 216 nm entre 25 e 90°C, a uma taxa de 1°C.min⁻¹, e com um tempo de resposta de 4 segundos. Foi utilizada uma cuvette de quartzo polarizada de 1mm de percurso ótico e uma concentração de proteína de 0.4mg.mL⁻¹.

As desnaturações químicas foram realizadas com ureia entre 0 e 8M, com uma concentração de proteína de 25 µM. Todas as amostras foram incubadas *overnight* à temperatura ambiente antes das medições. As desnaturações químicas da proteína com metais foram incubadas com os metais 1h à temperatura ambiente.

2.6. Método de análise de estabilidade

Para determinar a temperatura de desnaturação (T_m) foi utilizado o varrimento diferencial de fluorescência (DSF). A medição do T_m é uma medição indireta, com o auxílio do fluoróforo *Sypro Orange* (Invitrogen).

Foi utilizada uma placa de 96 poços, onde se distribuiu a proteína (6 μ M para dSOD1 e 12 μ M para mSOD1) e *Sypro Orange* 10x concentrada. As placas foram analisadas num instrumento de Real-Time PCR iCycler iQ (Bio-Rad), usando um filtro de excitação de 530 a 560 nm e um filtro de emissão de 575 a 595 nm. A temperatura variou de 20 a 90°C, com incrementos de 1°C.min⁻¹.

2.7. Método de análise da estrutura terciária

Para monitorizar alterações na estrutura terciária foi utilizado espectroscopia de fluorescência por emissão do triptofano. Foi utilizado o fluorímetro *Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer* (Varian), uma cuvette de quartzo de 1cm e uma abertura de feixe de emissão e de excitação de 10 nm. Todos os espectros foram realizados em modo contínuo, com uma velocidade de 600 nm/min, a 600 V e a 25°C.

Todos os ensaios foram realizados entre 300 e 450 nm e o comprimento de onda de excitação foi 280 nm e foi utilizada 5 μ M de SOD1.

2.8. Método de análise da hidrofobicidade

Para monitorizar alterações na exposição de zonas hidrofóbicas foi utilizado espectroscopia de fluorescência com o fluoróforo ANS. Foi utilizado o fluorímetro *Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer* (Varian), uma cuvette de quartzo de 1cm e uma abertura de feixe de emissão e de excitação de 10 nm. Todos os espectros foram realizados em modo contínuo com uma velocidade de 600 nm/min, a 600 V e a 25°C.

Todos os ensaios foram realizados entre 400 e 600 nm e o comprimento de onda de excitação foi 370 nm. Foi utilizado 5 μ M de SOD1 e ANS 10x concentrada e incubada com a proteína durante meia hora. Os ensaios na presença do ião zinco e do ião cobre foram realizados com uma incubação dos metais com a SOD1 durante 1 hora.

2.9. Ensaios cinéticos de agregação com o fluoróforo Tioflavina-T

Para determinar as cinéticas de agregação foi utilizado espectroscopia de fluorescência com o fluoróforo Tioflavina-T (*Sigma*). Os ensaios de cinética de agregação foram realizados a 37°C, numa placa de 96 poços (*Nunc FluoroNunc*), com tioflavina duas vezes mais concentrada que a proteína e com uma esfera de *Teflon* por cada poço. Durante a cinética as amostras estão a agitar a 600 rpm durante 5 minutos antes de cada ciclo. As placas foram analisadas num instrumento de *Fluorstar Optima* (BMG Labtech) usando um filtro de excitação de 440 nm e um filtro de emissão de 480 nm.

2.10. Análise de cinéticas de fibrilação

A conversão da SOD1 em fibras segue uma curva de crescimento característica, tipicamente descrita com *lag phase* (nucleação) e fase de crescimento (elongação). Um grande número de parâmetros empíricos pode ser obtido através da curva de crescimento das fibras, incluindo o tempo de *lag phase* (t_{lag}) e a velocidade aparente da reação (K_{app}). Este valor pode ser obtido a partir do *fitting* sigmoidal dos dados pela seguinte equação (Equação 2) [91]:

$$Y = (y_i + m_i x) + \frac{(v_f + m_i x)}{(1 + \exp^{-(X - X_0)/\tau})} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde Y é a intensidade de fluorescência, x é o tempo, X_0 é o t_{50} . O tempo da *lag phase* é calculado por $t_{lag} = X_0 - 2\tau$ e a velocidade aparente é calculada por $K_{app} = 1/\tau$

2.11. Dot Blot

Para diferenciar os agregados produzidos pelas cinéticas de agregação realizou-se *dot blot* com anticorpos conformacionais que permitem diferenciar oligômeros amilóides de fibras amilóides.

Foi utilizada uma membrana de PVDF para realizar a transferência, as amostras foram colocadas na membrana previamente tratada com metanol e embebida no tampão Tris/Glicina *electroblotting* e deixando-se secar *overnight*. No dia seguinte a membrana foi lavada com tampão TBS várias vezes e mergulhada em tampão com 5% de leite seguindo-se a incubação das membranas com os anticorpos *anti-Amyloid Fibril OC* (Millipore) e *anti-amyloid oligomer, $\alpha\beta$, oligomeric* (Millipore) com diluições de 1:1000 e 1:500, respetivamente. Foi lavada novamente com o tampão TBS-T e incubada com um anticorpo secundário durante 1h e posteriormente detetada por quimioluminescência.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Purificação da forma dimérica da hSOD1 (dSOD1)

A expressão da dSOD1 foi realizada utilizando um vector construído com um gene codificante da SOD1 e com um gene codificante da CCS de levedura (yCCS). Como se pode observar no gel SDS-PAGE (Figura 3.1 - C) há a co-expressão da dSOD1 com o metalochaperão do cobre yCCS. Esta estratégia é importante para obter um nível de expressão da dSOD1 mais elevado com uma estrutura mais integra e com uma correta incorporação do ião no sítio de ligação correspondente [92].

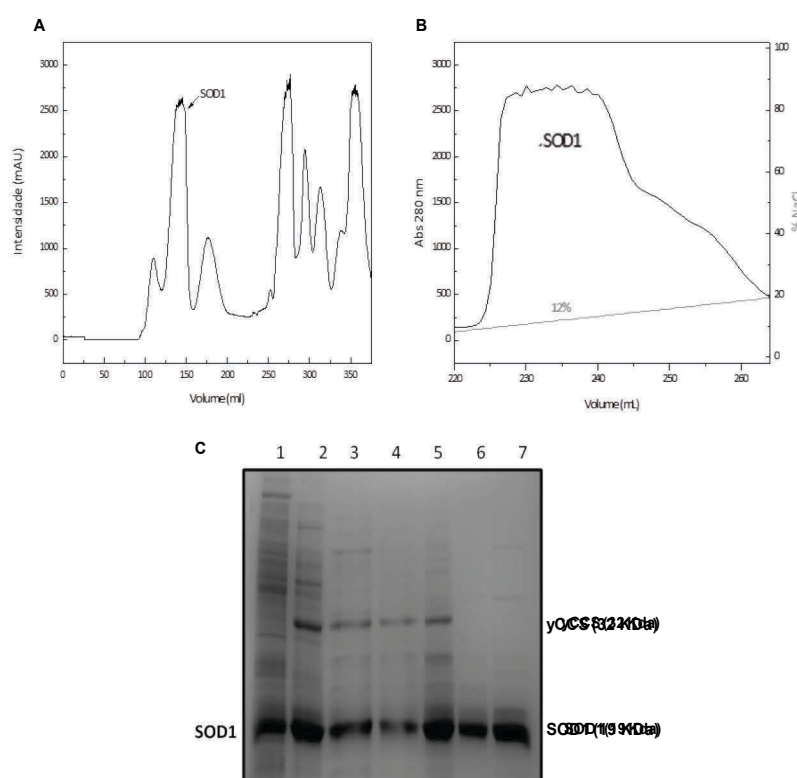


Figura 3.1: Purificação da dSOD1. **A** - Cromatograma da filtração em gel (Coluna *Sephacryl S-200 HR*); **B** - Cromatograma da separação por troca iónica (Coluna *Q-Sepharose Fast-Flow*); **C** - Gel SDS-PAGE que engloba todo o processo de purificação: 1- Extrato solúvel; 2- Sobrenadante após aquecimento a 65°C; 3- Sobrenadante após 50% de sulfato de amónio; 4- Sobrenadante após 60% de sulfato de amónio; 5- Antes da cromatografia de filtração em gel; 6- Antes da cromatografia de troca iónica; 7- dSOD1 com elevado grau de pureza

O extrato solúvel foi incubado a 65 °C, durante 30 minutos, para precipitar proteínas contaminantes e uma parte do yCCS. Como a dSOD1 tem uma elevada estabilidade térmica ($T_m=90^\circ\text{C}$) não precipita. De seguida realizou-se uma precipitação seletiva de proteínas com o aumento gradual de sulfato de amónio. Apenas a fração precipitada com 90% de sulfato de amónio contém a dSOD1. Posteriormente, foi realizada uma cromatografia de exclusão molecular, numa coluna *Sephacryl S-200 HR* (Figura 3.1 – A). Através desta cromatografia foi possível eliminar o principal contaminante do extrato, o chaperão yCCS. As frações que continham a dSOD1 foram eluídas numa coluna aniónica, *Q-Sepharose Fast-Flow*, (Figura 3.1 - B). Logo no início do gradiente de NaCl, a 12%, há a eluição da dSOD1. Foi obtido cerca de

80 mg de dSOD1 por litro de cultura, com um elevado grau de pureza, como se verifica no gel SDS-PAGE, no poço 7 (Figura 3.1 – C).

3.2. Purificação da SOD1-F50E/G51E (mSOD1 wt) e SOD1-F50E/G51E/G37R (mSOD1-G37R)

O mutante SOD1-F50E/G51E (mSOD1 wt) tem duas mutações na interface dimérica que impedem a formação do dímero, mimetizando a forma monomérica da proteína. O mutante SOD1-F50E/G51E/G37R (mSOD1-G37R) é um mutante associado à doença ELA e foi purificado de acordo com o mesmo protocolo.

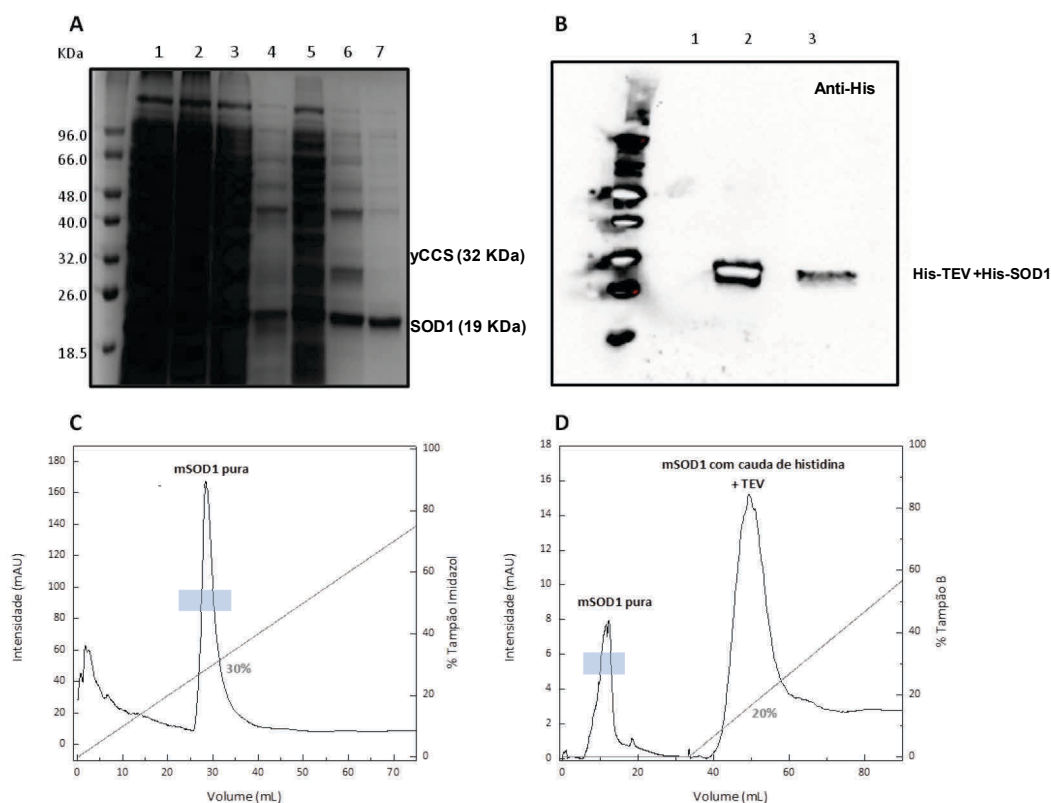


Figura 3.2: Purificação do mSOD1 wt. **A-** Gel SDS-PAGE que engloba todo o processo de purificação: 1- Extrato solúvel; 2 – Sobrenadante após centrifugação; 3- Sobrenadante após ultracentrifugação; 4 – mSOD1 com cauda Histidinas; 5 – extrato sem afinidade para a coluna; 6 – Hidrólise da mSOD1 pela TEV; 7 – mSOD1 pura; **B-** Western Blot referente à hidrólise: 1- mSOD1 hidrolizada; 2- TEV; 3- mSOD1 com cauda de histidina; **C-** Cromatograma referente à separação das proteínas com afinidade à His Tag do extrato solúvel, o retângulo azul representa a fração da mSOD1 wt pura; **D** – Cromatograma referente à separação da mSOD1 sem cauda de histidinas da TEV e restante mSOD1 mal hidrolizada, o retângulo azul representa a fração da mSOD1 wt pura.

Utilizando a mesma estratégia descrita para a purificação da dSOD1 a mSOD1 foi purificada com a co-expressão do yCCS. Observando-se no gel SDS-PAGE (Figura 3.2 - A) a co-expressão da mSOD1 (banda visível por volta dos 19KDa) com o chaperão do cobre yCCS (banda visível a 32 KDa).

O extrato solúvel foi eluído numa coluna *HisTrap* (Figura 3.2 - C) com o aparecimento de apenas um pico, durante o gradiente de imidazol. As frações que contêm a mSOD1 wt contêm alguns contaminantes, como se pode observar pelo gel SDS PAGE (Figura 3.2 – A:4).

As frações correspondentes à mSOD1 wt foram submetidas a uma hidrólise com a protease TEV para a remoção da cauda de histidinas. Posteriormente a mSOD1 wt foi eluída

novamente na coluna *HisTrap* (Figura 3.2 – D) para separar a mSOD1 com elevado grau de pureza, da TEV, que também foi construída com cauda de histidinas e da mSOD1 mal hidrolisada. Observando o gel de SDS PAGE (Figura 3.2 – A) verifica-se que se conseguiu purificar a mSOD1 com sucesso e com poucos contaminantes, contudo apenas se obteve 3 mg de mSOD1 com um elevado grau de pureza, por litro de cultura.

Foi realizado um *Western Blot* com um anticorpo específico para as caudas de histidinas (*AntiHisTag*), para verificar se a cauda de histidinas foi hidrolizada e pode-se observar que no poço da mSOD1 *wt* pura não é visível nenhuma banda. A ausência da banda da SOD1 é sinal que a hidrólise da cauda de histidina foi realizada com sucesso.

3.3. Análise do conteúdo metálico e atividade enzimática da SOD1

De seguida quantificou-se os metais, cobre e zinco presentes nos centros ativos da SOD1 purificadas. Verificou-se que o dSOD1 contém aproximadamente 2 iões de zinco e 2 iões de cobre, como seria de esperar. Contudo, no caso dos dois monómeros, de acordo com este método, concluiu-se que o mSOD1 *wt* purificado contém apenas 0.25 Cu²⁺ e nenhum zinco, por cada monómero e que o mutante mSOD1-G37R purificado contém 0.46 Cu²⁺ e nenhum zinco, por cada monómero (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Conteúdo metálico e Atividades específicas das diferentes formas da SOD1. n=3

	Conteúdo metálico		Atividade específica (U/mg)
	Cu ²⁺ / monómero	Zn ²⁺ / monómero	
dSOD1 metalada	1.38±0.25	0.81±0.23	16979±234
mSOD1 <i>wt</i>	0.25±0.07	0	1105±74
mSOD1-G37R	0.46±0.10	0	1007±67

Determinou-se igualmente a atividade enzimática das diferentes formas da SOD1, por um método descrito por McCord e Fridovich [89]. O valor da atividade específica foi determinado assumindo que uma unidade enzimática (1U) é a quantidade de SOD1 necessária para diminuir 50% da formação de citocromo c reduzido.

Há uma diminuição drástica da atividade do monómero na forma *wild type* e com a mutação associada à ELA, sendo cerca de 10% da atividade do dímero (Tabela 3.1) [93]. Não existe diminuição significativa entre a atividade do mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R, como está descrito na literatura [58]. O fato de não existir uma alteração da atividade específica entre a forma *wild type* e o mutante associado à ELA poderá ser devido à localização da mutação, visto que esta mutação faz parte da classe de mutações no barril β , e nesta classe geralmente não se verificam alterações significativas na atividade específica da SOD1.

3.4. Preparação da forma apo da SOD1

A forma desmetalada (apo) da SOD1 é a forma encontrada em agregados proteicos da SOD1 e pretende-se avaliar de que modo as modificações pós-traducionais contribuem para uma menor propensão para a agregação, como tal, procedeu-se à obtenção do estado apo da SOD1 através de um método descrito na literatura [53, 90].

Para o dSOD1 a preparação do estado apo foi eficaz, obtendo a proteína sem iões zinco nem iões cobre. Contudo nenhum dos métodos descritos foi eficaz no caso das formas monoméricas. Para a remoção dos iões metálicos da mSOD1 é necessário que a proteína

fique na forma desnaturada para expor os centros catalíticos e libertar os metais. Nas tentativas realizadas utilizou-se condições ácidas e condições na presença de guanidínio, sempre na presença de EDTA, para quelar os íons metálicos em solução. Após a libertação dos metais foi posteriormente iniciado a renaturação gradual da proteína através da reposição das condições fisiológicas. Durante as várias tentativas a proteína agregou em várias etapas do protocolo: durante a desnaturação, quer em condições ácidas, quer em condições com guanidínio e adicionalmente na fase de renaturação não houve solubilização destes agregados.

Na tentativa de melhorar o processo foi adicionado DTT, que é um redutor e que evita a formação de ligações aberrantes entre as duas cisteínas livres, C6 e C111, que poderão provocar agregação em condições não fisiológicas, como as descritas anteriormente. Observou-se menos agregação, mas um rendimento baixo (cerca de 30%). Como tal, optou-se por utilizar a proteína *as expressed*.

3.5. Análise estrutural da SOD1 na forma monomérica e na forma dimérica

Com o intuito de comparar alterações conformacionais das SOD1 purificadas procedeu-se a uma análise do estado conformacional das proteínas, recorrendo-se a CD longínquo e a espectroscopia de fluorescência (de emissão de triptofano e ANS).

Observou-se que as formas, monoméricas e diméricas, têm um espectro de CD, característico de folhas β (Figura 3.3 - A). Contudo há uma alteração da estrutura secundária do monómero, relativamente ao dímero. O espectro do dSOD1 tem um “ombro” por volta dos 230nm, característico da interação entre os grupos aromáticos das cadeias laterais, característica comum a proteínas com conteúdo em folhas β [94]. Esta característica não é visível na forma monomérica, talvez devido à maior flexibilidade dos *loops* IV e VII [44]. Observa-se que o mínimo de elipicidade, tanto do dSOD1 como do mSOD1 *wt* é por volta dos 208 nm que pode refletir a arquitetura de barril β antiparalelo.

Observa-se uma diminuição da estrutura secundária do mutante mSOD1-G37R, visto que o espectro tem menor intensidade e que há um desvio do mínimo de elipicidade, contudo as características da estrutura secundária são semelhantes ao mSOD1 *wt*. É um resultado algo inesperado pois mutações no barril β geralmente não afetam significativamente a estrutura da proteína [58].

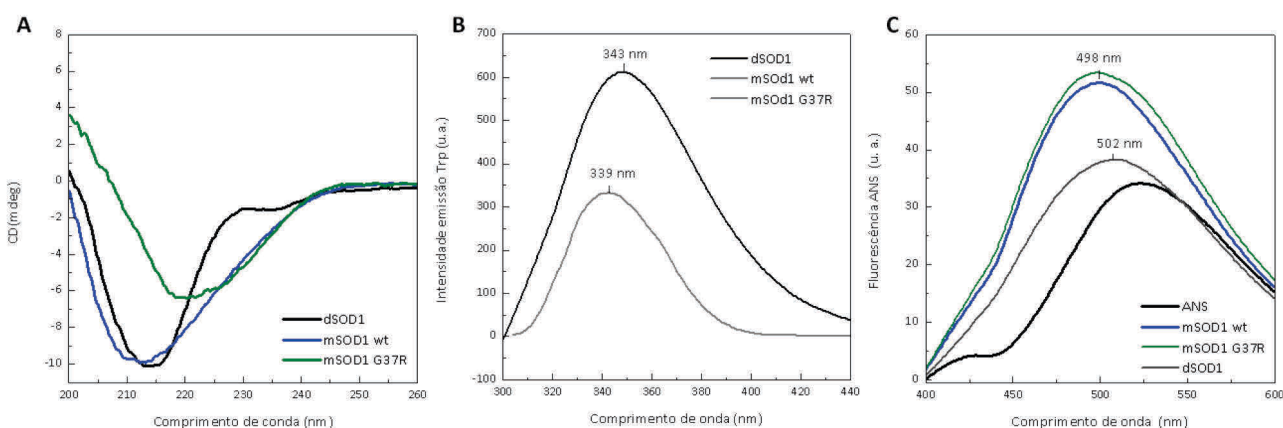


Figura 3.3: Comparação estrutural da mSOD1 *wt*, mSOD1-G37R e da dSOD1. A- Espectro de CD longínquo da dSOD1, mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R; B – Espectro de fluorescência de emissão do triptofano da dSOD1, mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R; C- Espectro de fluorescência com o fluoróforo ANS da dSOD1, mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R

Em relação à estrutura terciária da SOD1, observa-se, que a mSOD1 *wt* exibe uma diminuição de intensidade do espectro de fluorescência de emissão do triptofano e um desvio do comprimento de onda máximo de emissão do triptofano, para os azuis (de 343 nm para 339 nm), comparando com o dSOD1 (Figura 3.3 - B). Calculando o comprimento de onda médio de emissão (AEW), também se constata que o monómero tem um comprimento de onda médio de emissão inferior, podendo significar que tem o resíduo de triptofano menos exposto que o dímero (Tabela 3.2). Pode-se então concluir que a dimerização da SOD1 induz alterações na estrutura terciária. Observa-se também, que não há alterações na exposição do triptofano entre o mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R, podendo aferir que esta mutação associada à ELA não induz alterações na estrutura terciária da forma monomérica.

Tabela 3.2: Média dos comprimentos de onda de emissão do triptofano e do fluoróforo ANS

Fluorescência de emissão do Trp	AEW
dSOD1	359.7
mSOD1 <i>wt</i>	348.0
mSOD1-G37R	348.0
Fluorescência do fluoróforo ANS	
dSOD1	511.4
mSOD1 <i>wt</i>	507.7
mSOD1-G37R	507.7

Através do estudo da fluorescência com o fluoróforo ANS comparou-se a hidrofobicidade das diferentes formas da SOD1. O espectro do dSOD1 tem um aumento de intensidade pouco significativo, comparado com o espectro do ANS livre, exibindo um comprimento de onda máximo a 510nm. Estes dados são indicativos de uma estrutura bem empacotada e com poucas zonas hidrofóbicas expostas (Figura 3.3 – C). Em contraste, a forma monomérica (mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R) tem um aumento significativo da intensidade de ANS e um desvio do comprimento de onda máximo para 490 nm. Observa-se também que a média dos comprimentos de onda de emissão do ANS é inferior para mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R (Tabela 3.2). Este comportamento sugere que as formas monoméricas têm zonas hidrofóbicas muito expostas. O aumento de intensidade de fluorescência do ANS é característico de proteínas cuja conformação poderá ter uma forma não-nativa podendo-se especular que a forma monomérica não se comporta como o estado nativo.

Está descrito que o mutante SOD1-G37R, na forma dimérica, tem zonas hidrofóbicas mais expostas que a forma *wild type* da SOD1 [95]. Contudo, tal não acontece no caso da forma monomérica, podendo aferir que existe uma diferença conformacional na forma dimérica entre estas duas proteínas que se anula quando estão na forma monomérica.

3.6. Análise da estabilidade da SOD1 na forma monomérica e na forma dimérica

A SOD1 sem modificações pós-traducionais é a forma mais instável da proteína e poderá ser um dos estados da SOD1 mais propício para a agregação. A estabilidade da proteína é geralmente um fator crítico para melhor entender o processo pelo qual a SOD1 destabiliza e dá origem a agregados. A agregação da SOD1 é irreversível pelo que os valores termodinâmicos são aparentes.

3.6.1. Estabilidade térmica

Para estudar a estabilidade primeiramente foram realizadas desnaturações térmicas da mSOD1 *wt*, monitorizadas por CD. Observou-se uma transição bem definida, mas sem pós-transição (Figura 3.4). No entanto é pouco provável que esta transição corresponda à transição da desnaturação do mSOD1, visto que é uma transição com um T_m por volta dos 75°C, temperatura muito elevada para uma transição do mSOD1 *wt*, visto que é a forma da SOD1 mais instável e estando descrito que a apo dSOD1 tem um T_m entre os 45 e 55 °C [39].

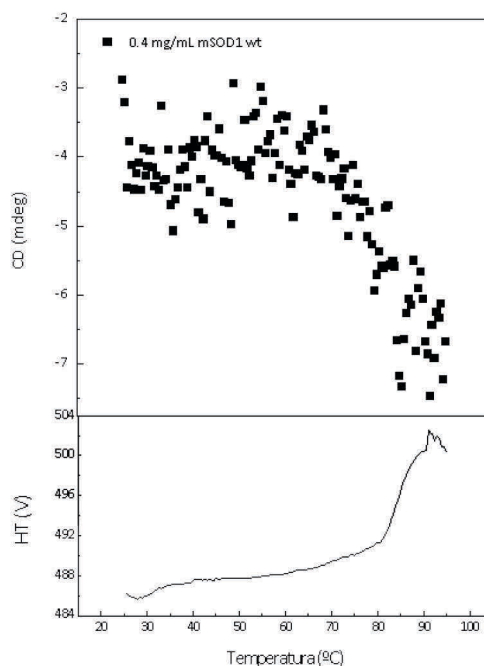


Figura 3.4: Estudos de estabilidade térmicas da mSOD1. Desnaturação térmica da mSOD1 *wt*, monitorizada por CD a 230 nm e monitorização da voltagem;

É possível que esta transição seja uma transição de agregação, visto que a voltagem monitorizada aumenta com o aumento da temperatura (Figura 3.4), característica comum à formação de agregados. É possível não se observar uma transição de desnaturação visto que a mSOD1 poderá estar num estado não-nativo, estado que está descrito como não tendo transições muito cooperativas [96]. Por este fato não foi possível monitorizar a estabilidade do monómero por esta técnica.

Foram, também realizados ensaios de DSF, com o fluoróforo *Sypro Orange*, para monitorizar e comparar a estabilidade da mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R com dSOD1. Observa-se uma transição bem definida para o dSOD1, com um T_m por volta dos 55°C, como seria de esperar. Contudo não se observa transição para o mSOD1 *wt* (Figura 3.5), talvez porque este estado da proteína não tem afinidade para o *Sypro Orange* ou porque o estado conformacional da proteína não permite transições de desnaturação cooperativas. Logo também não foi possível monitorizar a estabilidade do monómero por esta técnica.

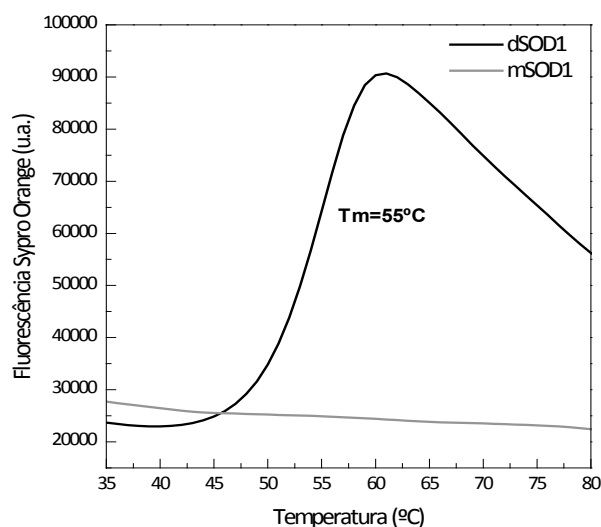


Figura 3.5: Estudos de estabilidade térmica da mSOD1. Desnaturação térmica do dSOD1 e mSOD1 wt, monitorizada por DSF;

3.6.2. Desnaturação química

Optou-se por monitorizar a estabilidade da mSOD1 wt e mSOD1-G37R através de desnaturações químicas, induzidas por ureia. Monitorizou-se o sinal a 230 nm por CD como repórter estrutural. Observa-se que a dSOD1 tem uma maior estabilidade que a forma monomérica, mSOD1, visto que tem um C_m mais elevado, indicativo de uma maior estabilidade (Figura 3.6 –A). Também se verifica que a dSOD1 tem uma curva de transição, entre o estado nativo e o estado desnaturado, mais definida, indicativa de uma transição cooperativa, o que não se pode verificar que o mSOD1 wt.

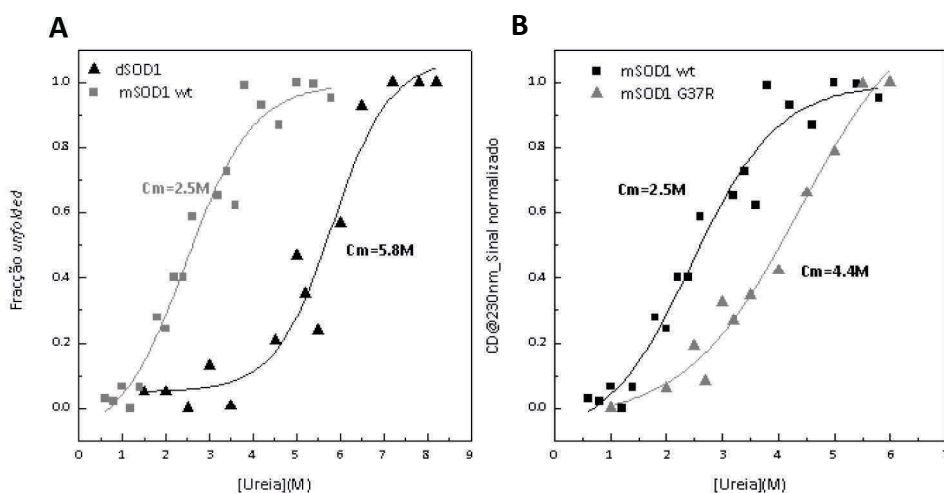


Figura 3.6: Estudos de estabilidade química da mSOD1. A – Comparação da estabilidade química entre dSOD1 e mSOD1 wt, induzida por ureia e monitorizada por CD a 230 nm; B – Comparação da estabilidade química entre mSOD1 wt e mSOD1-G37R, induzida por ureia e monitorizada por CD a 230 nm.

Observa-se que tanto o mSOD1 *wt* como o mSOD1-G37R não têm pré-transição e que a curva não é bem definida, talvez porque, como observamos pelo estudo estrutural do monômero, este não tem um estado nativo bem definido e poderá estar num estado não nativo, correspondente a um estado parcialmente desnaturado que poderá não contribuir para uma transição cooperativa. Observa-se um resultado atípico visto que o mSOD1-G37R tem uma maior estabilidade que o mSOD1 *wt*, com um C_m superior (Figura 3.6 – B). Não seria de esperar, visto que esta mutação, associada à ELA, localiza-se no barril β e está descrito que a forma dimérica deste mutante não tem diferenças na estabilidade [57]. Contudo ambas as formas monoméricas são menos estáveis que o dSOD1 (Tabela 3.3).

Tabela 3.3: Resumo dos valores de T_m e C_m , calculados por CD, DSF e desnaturação química das diferentes formas da SOD1. n.d. – dados não demonstrados

	$T_m^{(CD)}$ (°C)	$T_m^{(DSF)}$ (°C)	C_m (M)
dSOD1	55	55	5.8
mSOD1 <i>wt</i>	n.d.	n.d.	2.5
mSOD1-G37R	n.d.	n.d.	4.4

3.7. Efeito dos íons metálicos na estrutura e estabilidade da SOD1 monomérica

Está descrito que a adição dos íons metálicos promove a estabilidade da forma apo dimérica [37-38], mas ainda nenhum estudo foi realizado para a forma apo da SOD1 monomérica. Foi realizado um estudo conformacional e de estabilidade da forma monomérica, mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R, na presença dos íons metálicos, zinco e cobre, para estudar a sua influência. Os cofatores metálicos, zinco e cobre podem ser inseridos na forma apo da SOD1 através da adição dos sais metálicos, *in vitro*.

3.7.1. Efeito do íon zinco na estrutura e estabilidade da SOD1

O zinco é um dos cofatores da SOD1 e a sua ligação estabiliza a forma apo da proteína, através da diminuição da dinâmica dos *loops* [90, 97-98]. Sendo a forma monomérica a forma da SOD1 mais instável é relevante estudar as alterações na estrutura e estabilidade impostas pela inserção do íon zinco na SOD1.

Comparando as alterações estruturais induzidas pela adição de uma quantidade sobreestequiométrica de zinco, através do espectro de UV longínquo verifica-se que há uma diminuição da intensidade da banda em cerca de 4 mdeg e um desvio do comprimento de onda mínimo de 211 nm para 214 nm, no espectro do mSOD1 *wt* na presença de zinco (Figura 3.7 - A). Este resultado sugere que há uma perda de estrutura secundária e sugerindo que a presença do zinco destrutura a mSOD1 *wt*. Algo inesperado, visto que, na forma dimérica há um aumento de intensidade no CD a 230 nm quando é adicionado a mesma quantidade de zinco [99]. O mesmo comportamento observa-se no caso do mutante mSOD1-G37R, mas não de forma tão acentuado.

Para comprovar estes resultados foram realizados ensaios de fluorescência com o fluoróforo ANS. Observou-se um aumento de cerca de 30% da emissão de fluorescência de ANS e um desvio para comprimentos de onda inferiores, na presença do zinco (Figura 3.7 - B), tanto para o mSOD1 *wt* como para o mSOD1-G37R, significando que o zinco perturba a conformação da proteína potenciando ainda mais a exposição das zonas hidrofóbicas.

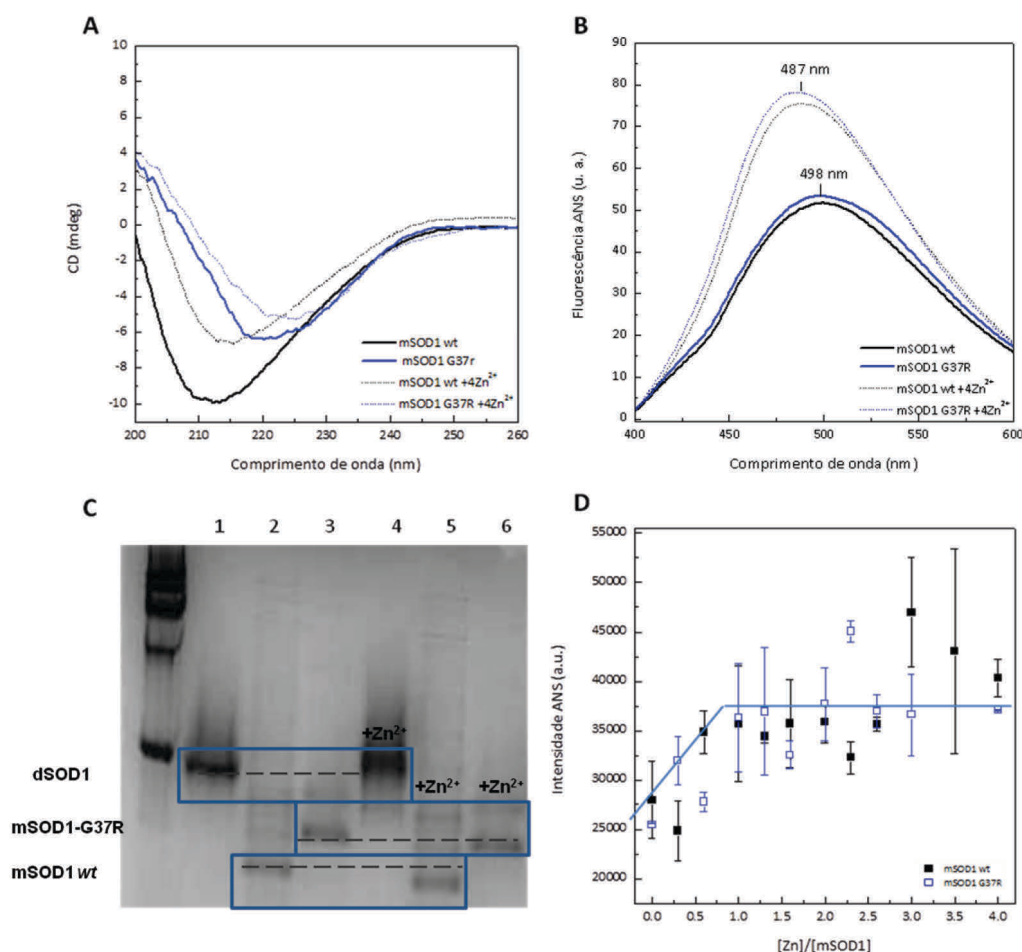


Figura 3.7: Efeito do íão zinco na estrutura da mSOD1 wt e mSOD1-G37R. **A** - Espectro de CD longínquo da dSOD1, mSOD1 wt e mSOD1-G37R, na presença de zinco; **B** - Espectro de fluorescência de emissão do fluoróforo ANS da dSOD1, mSOD1 wt e mSOD1-G37R, na presença de zinco; **C** - Gel nativo PAGE: 1- dSOD1; 2- mSOD1 wt; 3- mSOD1 G37R; 4- dSOD1 +4Zn²⁺; 5- mSOD1 wt+4Zn²⁺; 6- mSOD1 G37R +4Zn²⁺; **D** - Titulação do mSOD1 wt e mSOD1-G37R com zinco. Solução de mSOD1 wt e mSOD1-G37R incubada 1h com zinco em excesso (4 vezes mais concentrado que a proteína).

Como se verificou um aumento da intensidade de fluorescência do ANS com excesso de zinco, realizou-se uma titulação com diferentes proporções de zinco, para entender que quantidade de zinco é necessária para perturbar a conformação da proteína. Concluiu-se que há um aumento significativo da intensidade logo com a inserção de um íão zinco por cada monômero (Figura 3.7 - D), quantidade suficiente para preencher o centro ativo da proteína, podendo significar que a presença do íão de zinco não provoca *salting-in*, através de interações inespecíficas mas poderá atuar através da ligação específica do íão zinco ao centro ativo.

Para verificar se existem interferências na compactação das diferentes formas da SOD1 (dSOD1, mSOD1 wt e mSOD1-G37R) na presença de zinco foi realizado um gel nativo. Observa-se que a dSOD1 tem uma migração electroforética mais lenta, na presença de zinco (Figura 3.7 - C), sugerindo que a dSOD1 com zinco sofre uma alteração conformacional que torna a estrutura mais empacotada.

As duas formas monoméricas, mSOD1 wt e mSOD1-G37R, têm o comportamento oposto, dado que a presença de zinco há uma maior migração electroforética (Figura 3.7 - C). Estes resultados sugerem que, possivelmente, que há uma alteração conformacional quando

se adiciona o zinco que faz com que a estrutura fique menos empacotada, devido a uma alteração na carga e/ou conformação da proteína que faz com que esta migre mais.

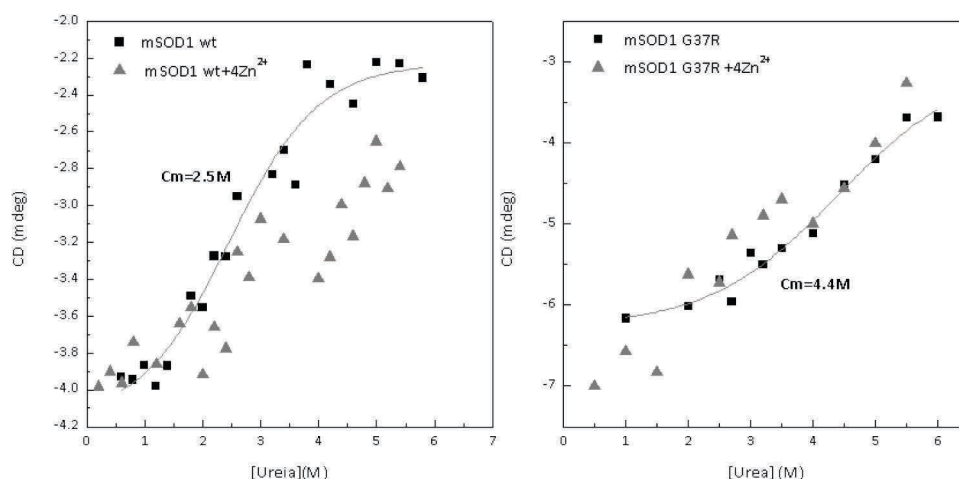


Figura 3.8: Efeito do íon zinco na estabilidade química da forma monomérica da mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R. Desnaturalizações químicas da mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R, na presença e na ausência de zinco em excesso (4 vezes mais concentrado que a proteína), induzida por ureia e monitorizada por CD, a 230 nm. Solução de mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R incubada 1h com zinco.

Visto que a SOD1, na forma monomérica, sofre alterações conformacionais na presença de zinco, sugerindo que está pouco estruturada foi-se realizar um estudo de estabilidade química com ureia. A mSOD1 *wt* na presença de zinco não apresenta uma transição cooperativa, nem um comportamento sigmoidal e não se observa um aumento de estabilidade (Figura 3.8). Aparenta ter diferentes estados conformacionais a participar na transição porque não há apenas uma transição definida. O mesmo comportamento se observa na forma mutada mSOD1-G37R. Apesar da forma mutada ter uma maior estabilidade, a adição de zinco não promove a sua estabilidade e também se observa uma transição pouco cooperativa e uma curva pouco definida (Figura 3.8). Um resultado algo inesperado visto que na forma dimérica a adição de zinco induz um aumento de estabilidade. Contudo, como a proteína tem pouca estrutura o íon zinco poderá ligar-se ao centro ativo do cobre ou aos dois centros ativos e não realizar a sua função estrutural.

3.7.2. Efeito do íon cobre na estrutura e estabilidade da SOD1

O cobre é um dos cofatores da SOD1 e a sua ligação estabiliza a forma *wild type* da proteína [97-98]. Realizou-se um estudo estrutural e de estabilidade da mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R na presença do íon cobre para aferir se este cofator metálico interfere na estrutura e estabilidade da forma mais instável da SOD1.

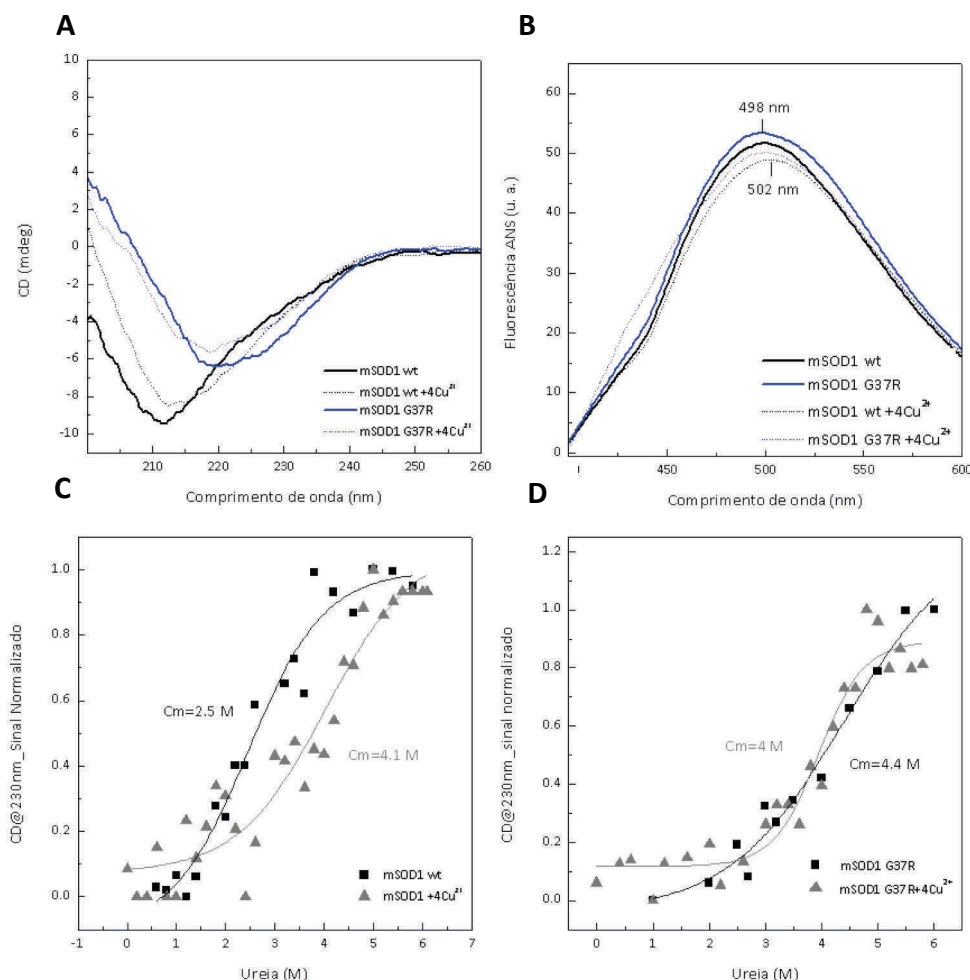


Figura 3.9: Efeito do íon cobre na estrutura e estabilidade da forma monomérica da SOD1 *wt* e G37R. **A** - Espectro de CD longínquo da dSOD1, mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R, na presença de cobre; **B** - Espectro de fluorescência de emissão do fluoróforo ANS da dSOD1, mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R, na presença de cobre; **C** - Desnaturação química da mSOD1 *wt* na presença de cobre; **D** - Desnaturação química do mSOD1-G37R, na presença de cobre. Solução de mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R incubada 1h com cobre em excesso (4 vezes mais concentrado que a proteína).

Observando as alterações estruturais induzidas pela adição de uma quantidade em excesso de cobre, através do espectro de CD verifica-se que não há uma alteração significativa do espectro, podendo significar que a estrutura secundária do mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R não se altera com a adição do cobre (Figura 3.9 - A). Pode não existir alterações conformacionais porque o íon cobre pode não se conseguir ligar ao centro ativo, visto que só quando o zinco se liga a SOD1 é que o centro ativo do cobre é formado.

Também não se observam alterações na intensidade de fluorescência de emissão do ANS, na presença de cobre (Figura 3.9 - B), significando que o cobre não expõe zonas hidrofóbicas e não provoca alterações na estrutura do mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R.

Mesmo sem alterações estruturais foi estudada a influência do íão cobre na estabilidade do mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R. Observa-se um aumento de estabilidade com a presença de cobre, no caso da mSOD1 *wt* (Figura 3.9 – C e D), visto que o C_m aumentou, algo inesperado visto que o cobre não influencia a estrutura da forma monomérica, logo este efeito pode ser devido a um efeito inespecífico do íão cobre que poderá estar a provocar um *salting-in*.

Não se observa uma alteração de estabilidade na presença de cobre, no caso do mutante mSOD1-G37R, concordando com a pouca influência do íão cobre na estrutura do mSOD1-G37R, contudo há um aumento da cooperatividade da transição, visto que a curva, na presença de cobre, tem um comportamento mais sigmoidal e um maior declive.

3.8. Análise da cinética de agregação do monômero e do dímero SOD1

A análise da estrutura e da estabilidade realizada anteriormente evidência que o monômero é menos estável que o dímero SOD1 e que tem uma conformação pouco estruturada com um estado não-nativo, nomeadamente com alguma estrutura secundária e que liga ANS, devido à exposição de zonas hidrofóbicas. Está descrito que estados conformacionais com estas características têm mais propensão a agregar, visto que o aumento da exposição de zonas hidrofóbicas pode potenciar interações aberrantes [100-101]. Neste sentido realizou-se um estudo de cinética de agregação do mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R em comparação com a cinética de agregação da forma dimérica, dSOD1.

3.8.1. Análise da dependência da cinética de agregação do mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R em função da concentração

Foram realizados estudos de cinética de agregação do mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R através de fluorescência de emissão da Tioflavina T (ThT), um fluoróforo que se intercala entre as folhas β em estruturas do tipo amiloide, emitindo fluorescência nestas circunstâncias [102].

De modo a escolher as condições para monitorizar as cinéticas de agregação do monômero foi realizado um estudo do mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R na presença e na ausência de condições redutoras (5 mM de TCEP), visto que está descrito que as condições redutoras potenciam a fibrilação da SOD1 em condições fisiológicas [41].

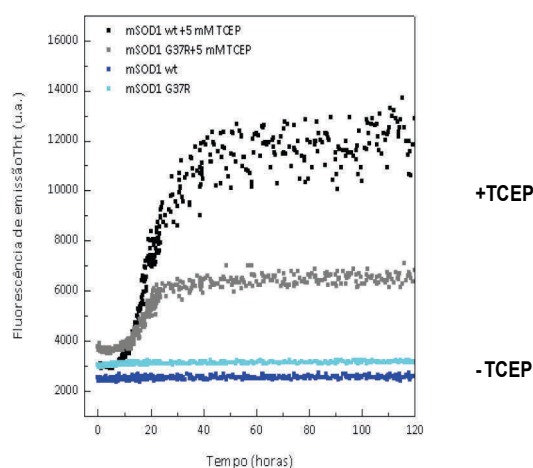


Figura 3.10: Cinéticas de agregação do mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R na presença e ausência de ambiente redutor. 0 mM TCEP e 5 mM TCEP

Não se observa um aumento de intensidade do ThT na ausência de TCEP, tanto no mSOD1 *wt* como no mSOD1-G37R (Figura 3.10). Existem diferentes razões para justificar a ausência de agregação na ausência de um ambiente redutor. O período de tempo poderá não ter sido suficientemente longo para se observar a agregação ou os agregados formados poderão não ter afinidade para o ThT. Outras possíveis explicações poderão estar relacionadas com as condições de agitação e com a presença da esfera de *Teflon*. Estas condições podem induzir alterações conformacionais que impedem a formação de agregados ordenados e que direcionam a agregação para a formação de oligómeros e agregados amorfos ou talvez porque, nestas condições, não há simplesmente a formação de agregados.

Contudo com a presença do redutor TCEP, observa-se uma cinética de agregação (Figura 3.10) e como tal, optou-se por esta condição para a monitorização das cinéticas de agregação.

Uma vez escolhida a condição para realizar as cinéticas de agregação foi realizado um estudo com diferentes concentrações de mSOD1 e mSOD1-G37R: 25; 50 e 100 μ M, para avaliar o nível de dependência da cinética de agregação em função da concentração.

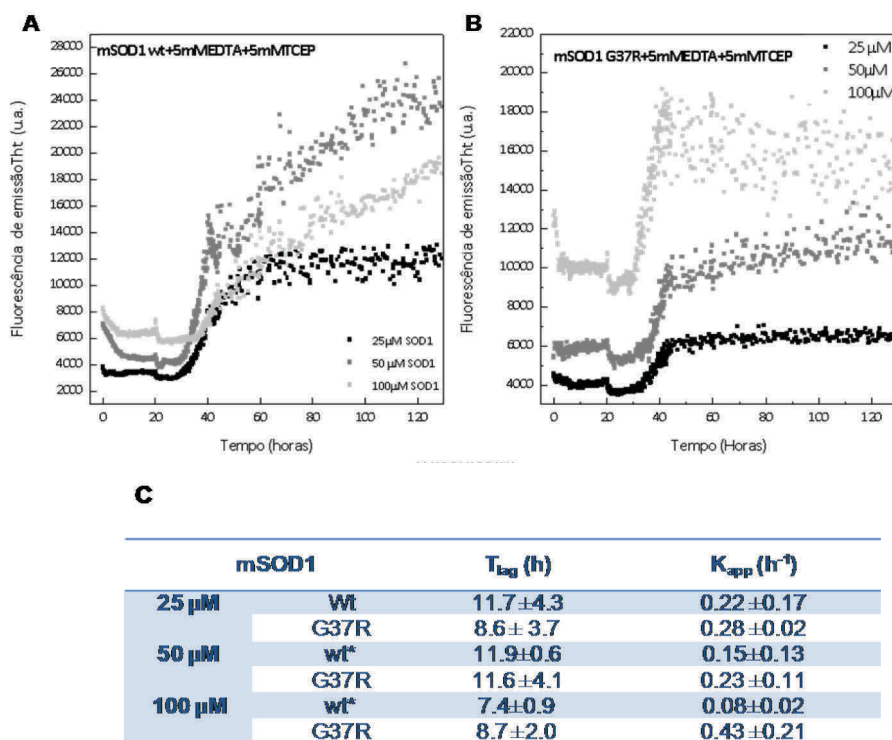


Figura 3.11: A e B - Cinéticas de agregação do mSOD1 wt e mSOD1-G37R com diferentes concentrações; C – Tabela representativa dos tempos da lag phase e velocidades aparentes das cinéticas de agregação. n=3; * Foi realizado o fitting sigmoidal apenas para a parte inicial da curva

Observando as cinéticas de agregação das diferentes concentrações da mSOD1 wt e mSOD1-G37R constata-se que todas as curvas têm características sigmoidais. O comportamento sigmoidal é característico de um processo de agregação dependente da nucleação e quando tal ocorre a reação poderá ser iniciada maioritariamente com espécies monoméricas. Mas frequentemente as reações são heterogénea, onde há a formação de várias formas de agregados e onde o crescimento é dependente tanto das espécies monoméricas, quanto de fibras já existentes.

Também se constata um aumento de fluorescência de emissão do ThT com o aumento de concentração, visto que quanto mais concentrada está a proteína, mais formação de agregados irá ocorrer, logo mais sítios disponíveis para o ThT se ligar (Tabela 3.4).

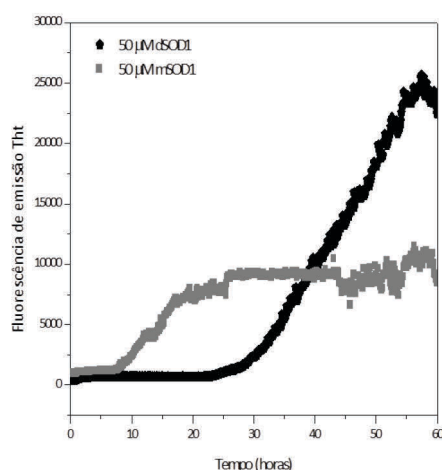
Tabela 3.4: Intensidade inicial da fluorescência emitida pelo ThT na presença da mSOD1 wt e mSOD1-G37R

		Intensidade inicial do ThT (u.a.)
[mSOD1 wt] (μ M)	25	3035 \pm 329
	50	4384 \pm 574
	100	6228 \pm 542
[mSOD1-G37R] (μ M)	25	3574 \pm 142
	50	5073 \pm 307
	100	9523 \pm 185

Observou-se que o início da agregação não é dependente da concentração da SOD1, dentro da gama escolhida, 25 a 100 μ M, visto que o tempo de *lag phase* (T_{lag}) é semelhante para as três concentrações (Figura 3.11) e que também não se observam alterações significativas da velocidade aparente (K_{app}), podendo concluir que a nucleação do mSOD1 wt e mSOD1-G37R não é dependente das concentrações nas condições de agregação utilizadas (600 rpm, 37°C a pH7.5). Como o mecanismo de agregação por nucleação implica necessariamente uma dependência do tempo de nucleação com a concentração inicial é possível que o fato de não se ter observado uma dependência entre a concentração da proteína e a formação do núcleo de agregação (início de agregação) poderá significar que as concentrações utilizadas são muito superiores à concentração mínima para a formação de agregados. Também poderá ser causado porque a agitação provoca alterações conformacionais que promovem a hidrofobicidade na proteína e potenciam a agregação. Podendo ser, nestes ensaios, um fator dominante e mascarar o efeito das diferentes concentrações. Não se denota diferenças entre a cinética de agregação da mSOD1 wt e da mSOD1-G37R (Figura 3.11), podendo significar que a mutação não aumenta a propensão para agregar ou poderá existir a formação de agregados que não têm afinidade para o ThT, visto que a intensidade máxima de fluorescência é ligeiramente inferior, resultado da menor ligação ao ThT na forma mutada. Esta hipótese é corroborada pela evidência na literatura que este mutante dá origem a fibras mais desordenadas que poderão não ter afinidade para o ThT [63]. Para confirmarmos se poderá existir a formação de agregados sem afinidade para o ThT, no caso do mutante, no futuro irão ser realizadas cinéticas de agregação monitorizadas por DLS e *dot blots* com anti-corpos conformacionais, anti-fibras e anti-oligómeros.

3.8.2. Comparação da cinética de agregação da forma dimérica e da forma monomérica da SOD1

De seguida comparou-se a cinética de agregação da forma dimérica com a cinética de agregação da forma monomérica. Observa-se que ambas têm um comportamento sigmoidal, característico de processos de agregação dependentes de nucleação mas a mSOD1 wt tem uma *lag phase* menor (Figura 3.12), podendo-se concluir que o monómero é mais propenso para agregar que a forma dimérica, possivelmente porque a conformação do mSOD1 inicial tem características conformacionais que propendem a formação de ligações inter-moleculares proteína-proteína. Observa-se que o mSOD1 tem uma velocidade aparente de agregação aproximadamente duas vezes superior à do dímero.

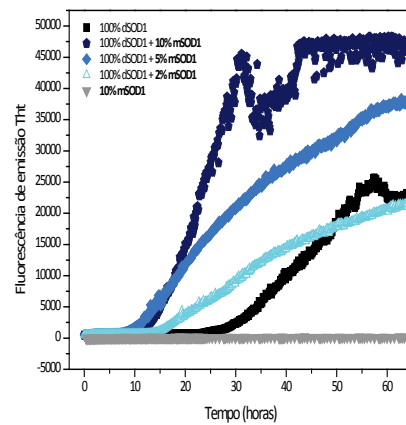


	$T_{lag} \text{ (h)}$	$K_{app} \text{ (h}^{-1}\text{)}$
dSOD1	27.0 ± 3.9	0.14 ± 0.02
mSOD1	11.9 ± 0.7	0.29 ± 0.03

Figura 3.12: Comparação de cinéticas de agregação do dSOD1 e mSOD1, na presença de 5 mM TCEP. Tabela representativa do tempo de *lag phase* e velocidade aparente das cinéticas de agregação do mSOD1 wt e dSOD1. n=3

3.8.3. O monômero potencia a agregação do dímero

Os agregados proteicos são uma das características das doenças neurodegenerativas, como a ELA, e estes agregados contêm uma mistura distinta de proteínas e diferentes formas conformacionais das proteínas que podem dar origem às fibras amilóides. A forma monomérica da SOD1 foi detetada em extratos da medula espinal de murganhos transgênicos que expressavam mutantes da SOD1 [59, 103]. Foi testada a possibilidade da forma monomérica acelerar e potenciar a agregação da forma dimérica da SOD1, visto que esta é uma proteína muito estável em condições fisiológicas e que deverá existir um fator que despolette a agregação. Para tal, realizou-se um ensaio de *seeding*, que consiste em testar se pequenas concentrações da forma monomérica influenciavam a cinética de agregação do dímero. Observou-se que percentagens baixas de monômero, 2%;5% e 10% aceleram a formação do núcleo de agregação do dímero (Figura 3.13). O tempo de *lag phase* do dímero é de aproximadamente 27 horas, contudo na presença de pequenas proporções de monômero o tempo de *lag phase* diminuiu para cerca de 17 horas. No caso de 5% e 10% de monômero a intensidade da fluorescência é maior o que sugere uma maior formação de agregados com afinidade para o ThT. Observa-se simultaneamente um aumento da velocidade aparente da fibrilação no dímero quando na presença de quantidades reduzidas de monômero, chegando mesmo a assemelhar-se à velocidade aparente do mSOD1 wt isoladamente. Estes resultados sugerem que o mSOD1 wt mesmo em pequena proporção tem um elevado impacto, tanto na formação do núcleo de agregação (diminuição da *lag phase*), como na velocidade de formação de fibras



	T_{lag} (h)	K_{app} (h^{-1})
dSOD1	27.0 ± 3.9	0.14 ± 0.02
mSOD1	11.9 ± 0.7	0.29 ± 0.03
2% mSOD1	17.0 ± 0.5	0.30 ± 0.01
5% mSOD1	15.5 ± 3.6	0.29 ± 0.06
10% mSOD1	17.1 ± 0.9	0.33 ± 0.03

Figura 3.13: Comparação de cinéticas de agregação da SOD1 com seeding do monômero. Cinéticas de agregação do dímero com seeding do monômero: 10%, 5% e 2% de mSOD1, na presença de 5mM EDTA e 5 mM TCEP. Tabela representativa dos tempos da lag phase e velocidades aparentes das cinéticas de agregação. n=3

3.9. Influência de metabolitos na estabilidade e agregação da SOD1

Foram identificados, no fluido cérebroespinal, metabolitos que se encontram alterados em pacientes com ELA. [68-69, 104]. Observa-se uma diminuição da concentração da maior parte destas pequenas moléculas em pacientes que expressam mutantes da SOD1. Com exceção da xilose e do ácido eritrônico que se encontram em concentrações superiores às concentrações fisiológicas. Contudo nenhum estudo de estabilidade ou de agregação proteica foi realizado para verificar se existe uma relação entre a desregulação na homeostase dos metabolitos e a estabilidade da SOD1. Tal estudo já foi realizado para outras doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer, onde foram encontrados metabolitos que afetam a agregação [105-106].

O objetivo deste estudo foi o de estudar a influência de 15 pequenas moléculas, na estabilidade e no mecanismo de agregação da SOD1. Para tal, utilizaram-se como modelos de estudo a apoSOD1 (dSOD1) e a apoSOD1 na presença de 10 mM de TCEP (mSOD1^{SH-SH}). A presença de 10 mM de TCEP numa solução de SOD1 provoca a disrupção das forças eletrostáticas da interface dimérica, formando uma população rica na forma monomérica, comprovada por filtração em gel (Figura 3.14). Desta maneira simula-se a forma monomérica da SOD1. Não foi utilizado o mutante SOD1-F50E/G51E porque os ensaios de estabilidade foram realizados por DSF e este não tem afinidade para o *Sypro Orange* e porque este mutante não agrega na ausência de redutor, como já foi demonstrado anteriormente.

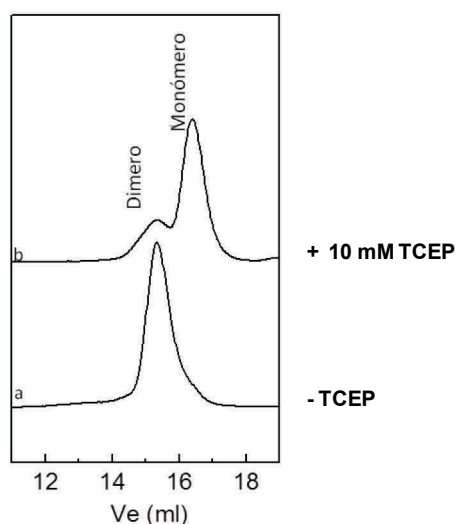


Figura 3.14: TCEP induz a conformação monomérica da apoSOD1, de acordo com a filtração em gel. (a) 0 mM TCEP; (b) com 10mM TCEP

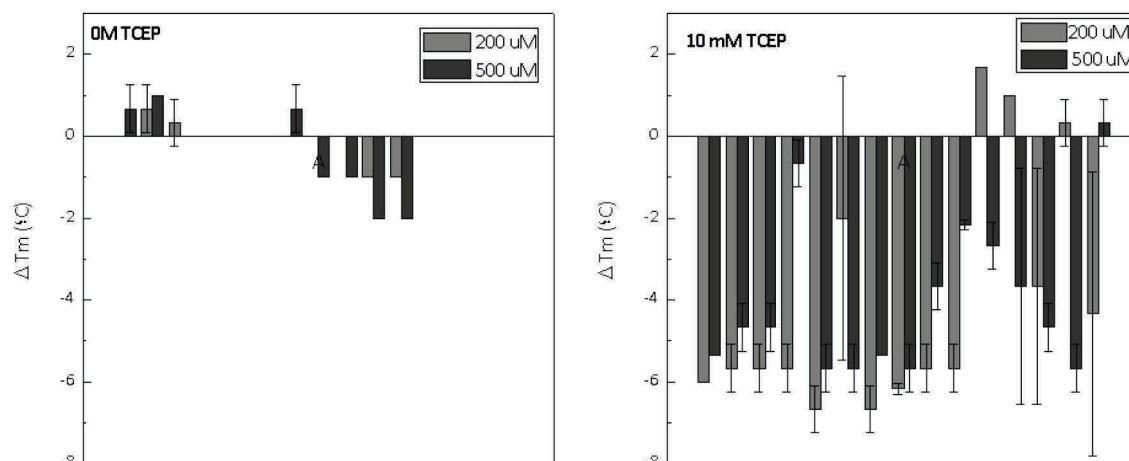
As concentrações normais dos metabolitos no fluido cérebroespinal estão entre 20 e 200 μ M [107], e por isso optou-se testar duas concentrações de metabolitos, uma dentro das condições fisiológicas, 200 μ M, e uma concentração em excesso, 500 μ M. Nos ensaios foram utilizadas concentrações neurofisiológicas da SOD1 (6 μ M para os ensaios de DSF e 50 μ M para os ensaios de fibrilação) [65].

Tabela 3.3: Pequenas moléculas utilizadas para o estudo de estabilidade da SOD1.

Molécula	Classe do composto	Alteração da concentração
Glutamina	Aminoácido	-
Treonina	Aminoácido	-
Frutose	Monossacarídeo	-
Xilose	Monossacarídeo	+
Fenilalanina	Aminoácido	-
Arginina	Aminoácido	-
Ácido eritróico	Ácido orgânico	+
Ácido Aspártico	Aminoácido	-
Serina	Aminoácido	-
Ornitina	Aminoácido	-
Lisina	Aminoácido	-
Ácido Glicérico	Ácido orgânico	-
Ftalato	Exógeno	-
Ácido Piroglutâmico	Aminoácido	-
Valina	Aminoácido	-

O primeiro passo consistiu no estudo da influência destes metabolitos (Tabela 3.5) na estabilidade da forma dimérica (dSOD1) e monomérica (mSOD1^{SH-SH}), recorrendo a DSF, na presença do fluoróforo *Sypro Orange*.

A



B

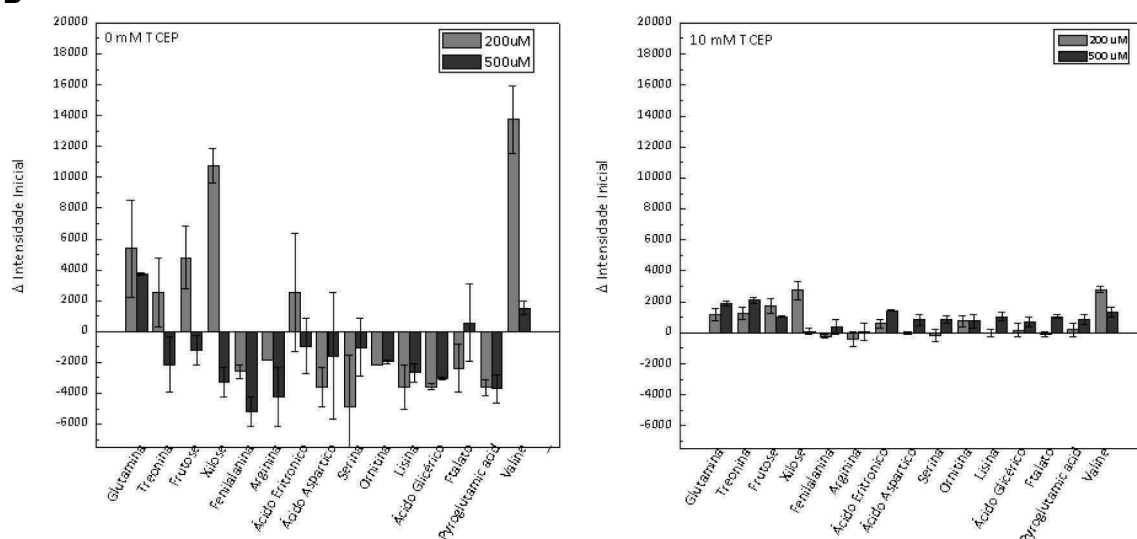


Figura 3.15: Dependência da estabilidade da SOD1 na presença de metabolitos, dSOD1 (0mM TCEP) e mSOD1^{SH-SH} (10 mM TCEP). A estabilidade térmica foi determinada por DSF na presença de 200 μ M e 500 μ M dos metabolitos: Glutamina, Treonina, Frutose, Xilose, Fenilalanina, Arginina, Ácido eritrônico, Ácido aspártico, Serina, Ornitina, Lisina, Ácido glicérico, Ftalato, Ácido glutâmico e Valina. Está representada a variação de temperatura de desnaturação (T_m) (**A**) e intensidade inicial (**B**) entre a SOD1 livre e com metabolitos. A concentração da SOD1 foi de 6 μ M

Não se observou uma alteração significativa na estabilidade do dSOD1 na presença dos metabolitos, contudo verificou-se uma alteração da estabilidade do mSOD1^{SH-SH} na presença da grande maioria dos metabolitos testados (Figura 3.15), com exceção do ácido glicérico e da lisina que a 200 μ M não se observou um efeito significativo. O facto de a maioria dos compostos diminuir significativamente o T_m ($\approx 5^{\circ}$ C) permite concluir que os metabolitos têm um efeito destabilizador na forma monomérica da SOD1, mas não na forma dimérica. Este efeito poderia ser causado por características físicas destas pequenas moléculas, contudo, não há propriedades comuns, algumas moléculas são carregadas positivamente a pH 7, como a lisina, a arginina, outros são carregados negativamente, como o ácido aspártico e o ácido glutâmico, e outros não têm carga, como a serina e a treonina. O caracter hidrofóbico também é heterogéneo para este conjunto de moléculas.

O *Sypro Orange* é um fluoróforo que se liga a zonas hidrofóbicas expostas na superfície da proteína. A variação da intensidade inicial de fluorescência do *Sypro Orange* com a adição dos metabolitos retém informação sobre as diferenças de hidrofobicidade da proteína impostas pela presença destas pequenas moléculas. Na figura 3.15 - B pode-se observar que

no mSOD1^{SH-SH} a variação da intensidade inicial, com e sem metabolitos, não é significativa, podendo significar que não há alterações significativas na hidrofobicidade da superfície da proteína ou que há uma ligação preferencial do metabolito à cadeia polipeptídica que impede a interação do *Sypro Orange* com as zonas hidrofóbicas da proteína. Curiosamente, na forma dSOD1 observa-se uma heterogeneidade da variação da intensidade inicial. A maior parte dos metabolitos induzem uma alteração conformacional que diminui as zonas hidrofóbicas expostas, visto que a variação é negativa. Porém também se encontram alguns metabolitos que provocam o aumento das zonas hidrofóbicas expostas, podendo dever-se ao fato de os metabolitos não interagirem com a proteína. No global os resultados sugerem que os metabolitos têm um efeito diferencial entre a forma monomérica e dimérica.

Como se observou alterações na estabilidade térmica com a adição dos metabolitos na forma monomérica foi realizado um estudo conformacional da dSOD1 e mSOD1^{SH-SH} com o intuito de compreender a influência dos metabolitos na estrutura da SOD1. Foram escolhidos 5 dos 15 metabolitos para realizar o estudo conformacional: Lisina, Ftalato, Ornitina, Arginina e Ácido glicérico. Em anexo estão presentes os espectros de CD, que monitorizam as alterações na estrutura secundária e espectros de fluorescência de emissão de triptofano e de emissão de ANS, que monitorizam alterações na estrutura terciária (Anexo III e IV).

A maior parte dos metabolitos induz uma diminuição da estrutura secundária (Anexo III), estando de acordo com a diminuição da estabilidade. Estes metabolitos poderão interagir inespecificamente com a proteína, atuando como chaperões químicos, mas ligando-se preferencialmente à cadeia polipeptídica, induzindo uma alteração da estrutura e destabilizando a proteína. Porém, curiosamente, a lisina aumenta a estrutura secundária do dSOD1 e o ácido glicérico aumenta a estrutura secundária do mSOD1^{SH-SH}. Verifica-se, também um aumento de intensidade de emissão do triptofano no dSOD1, na presença de metabolitos, mas não houve um desvio do comprimento máximo (Anexo IV), logo os aminoácidos aromáticos não estão mais expostos na presença dos metabolitos. No mSOD1^{SH-SH} não houve alterações no espectro, significando que não há alterações na estrutura terciária, nas proximidades do resíduo triptofano.

Não se manifestam alterações da intensidade de fluorescência de emissão do ANS, podendo significar que não existe alterações nas zonas hidrofóbicas, na presença dos metabolitos. Porém estes dados contrariam os dados da intensidade inicial do *Sypro Orange*. Contudo o modo de ligação destes dois fluoróforos pode ser diferente. O ANS interatua com os grupos hidrofóbicos da proteína através de forças electroestáticas com o seu grupo apolar anilino-naftaleno [108], contudo o *Sypro Orange* tem a formula patenteada e ainda não é conhecido o seu modo de ação.

Visto que existe uma destabilização da estrutura e estabilidade da dSOD1 foram realizadas cinéticas de fibrilação com o fluoróforo ThT para denotar se os metabolitos interferem também no mecanismo de agregação da SOD1 (Figura 3.16). Observou-se que os metabolitos não têm influência significativa e reprodutível na agregação da mSOD1^{SH-SH} (dados não apresentados). Contudo, no caso da dSOD1 observa-se um comportamento diferencial. Há uma inibição da fibrilação da dSOD1 na presença dos metabolitos (exceto ácido glicérico, que funciona como promotor) verificada pelo aumento dos tempos de *lag phase*, cerca de 15 horas e pela diminuição da velocidade aparente para cerca de metade (Figura 3.16). Contudo não se observa uma curva sigmoidal bem definida na presença dos metabolitos e há uma menor ligação do ThT à dSOD1. Tal pode significar que o mecanismo de fibrilação da dSOD1 na presença de metabolitos poderá ser diferente e os agregados formados não têm afinidade para o ThT. Porém a intensidade do ThT pode ser afetada pelas interações entre o ThT e o metabolito e pelas ligações competitivas do metabolito pela superfície da fibra.

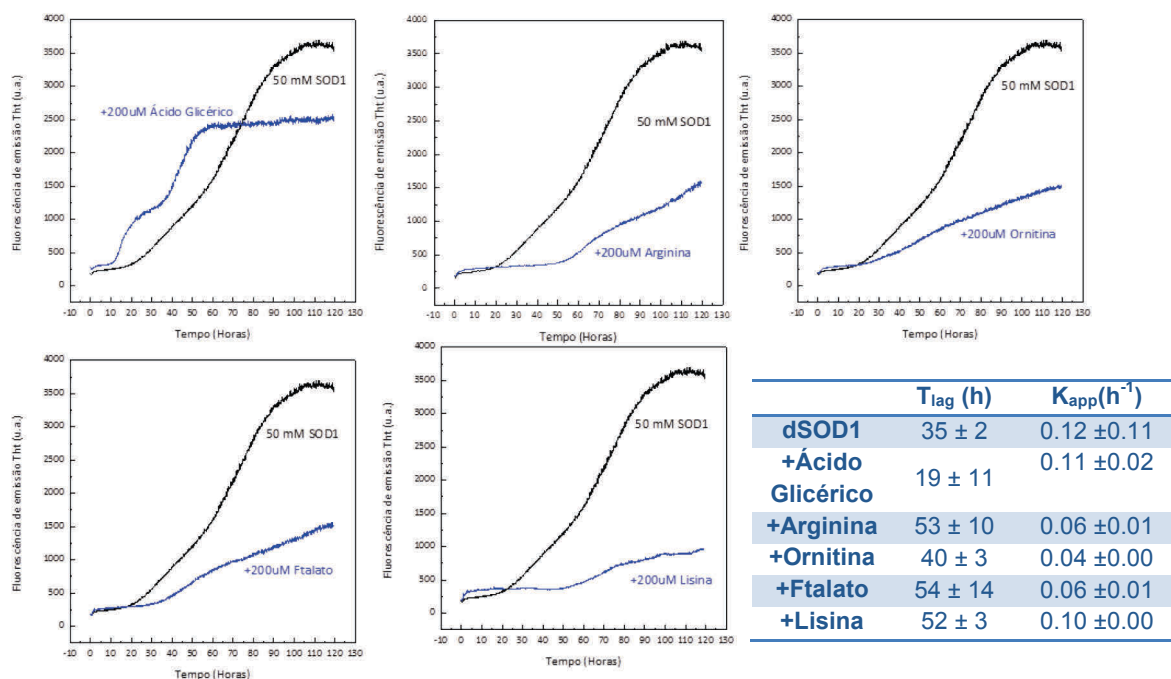

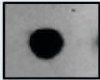
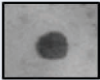


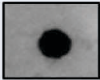


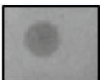





Figura 3.16: Cinéticas de agregação do dSOD1 na presença de 5 metabolitos: Ácido Glicérico, Arginina, Ornitina, Ftalato, Lisina. Tabela representativa do tempo de lag phase (T_{lag}) e da velocidade aparente (K_{app}) do dSOD1 na presença dos metabolitos.

Para distinguirmos os tipos de agregados formados na dSOD1 na presença dos metabolitos, foi realizado um *dot blot* com os anticorpos conformacionais: anti-oligómeros (Anti-A11) e anti-fibras (Anti-OC) e com os agregados da dSOD1 presentes na fase estacionária da cinética de agregação. Observou-se que há uma maior intensidade de conformações reconhecidas pelo anti-corpo A11 que pelo anti-OC, sendo que o anti-A11 reconhece especificamente oligómeros pré-fibrilares, não tendo afinidade para fibras, monómeros ou proteínas nativas, podendo significar que as cinéticas de agregação da dSOD1 formam uma quantidade superior de oligómeros em prol da formação de fibras.

Não se verifica uma grande alteração nas intensidades dos *dot blot* na presença ou ausência dos metabolitos, reconhecidas pelo anti-oligómeros, podendo-se concluir que, apesar do processo de agregação ser diferente, ambos produzem espécies oligoméricas indiferencialmente. À exceção do fthalato, molécula na presença da qual se observa uma diminuição de cerca de 25% do sinal, podendo suspeitar que a agregação da dSOD1 formada na presença do fthalato resulta em agregação menos direcionada para a formação de espécies oligoméricas. O mesmo comportamento verifica-se no caso do anti-fibras, pois também não se observam alterações entre o dSOD1 na presença ou ausência dos metabolitos sugerindo que a presença dos metabolitos não interfere com a formação das espécies fibrilares. Com exceção do aumento da intensidade do *dot blot* na presença da ornitina e diminuição em cerca de 20% na presença da arginina, curiosamente, visto que as cinéticas de agregação são semelhantes.

	SOD1	+Lisina	+Ftalato	+Ornitina	+Arginina	+Ácido Glicérico
Anti A11 (Anti-oligómeros)						
Anti OC (Anti-fibras)						

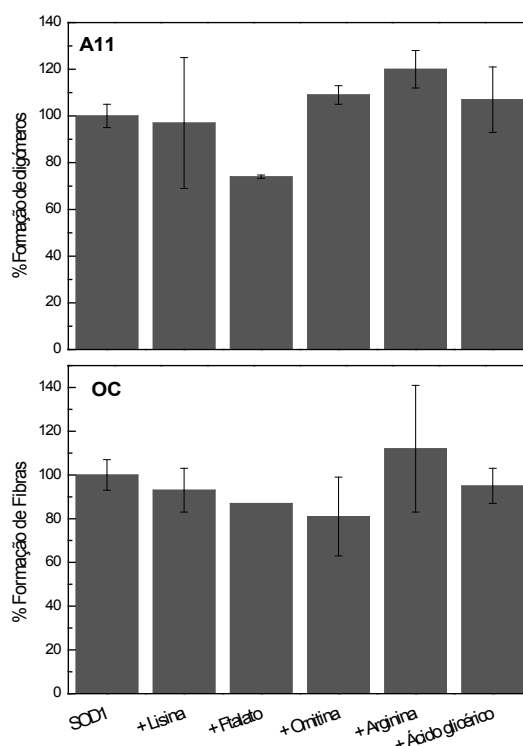


Figura 3.17: Dot Blots da dSOD1, na presença de metabolitos com anticorpos conformacionais Anti-A11 (anti-oligómeros) e Anti-OC (Anti-Fibras). Gráficos representativos da percentagem de formação de oligómeros e de fibras. Considera-se 100% a dSOD1 na ausência de metabolitos. As intensidades dos *dot blots* para a realização das percentagens foram calculadas com o programa *Quantity One* (BioRad).

IV. CONCLUSÕES

Uma característica comum para diversas doenças neurodegenerativas é a deposição de agregados proteicos em neurónios. Mutações nos genes de proteínas associadas à forma familiar destas doenças podem causar agregação pela simples alteração do *fold* nativo e consequentemente das propriedades físico-químicas intrínsecas, como a hidrofobicidade e/ou pela alteração da estabilidade. Contudo o mecanismo que leva à agregação de proteínas altamente estáveis, como a SOD1, ainda permanece desconhecido.

A forma monomérica sem metais da SOD1 é o estado conformacional da proteína mais instável, quer na forma *wild type* quer quando ocorrem mutações associadas à ELA [99, 109], sendo fulcral estudar o mecanismo de agregação desta forma e estudar a influência desta forma na agregação da forma dimérica.

Inicialmente foi realizado um estudo comparativo das alterações conformacionais e de estabilidade impostas pelo processo de monomerização (mSOD1 *wt*) bem como com uma mutação associada à ELA, mSOD1-G37R. Os resultados aqui apresentados revelam que tanto o mSOD1 *wt*, como o mSOD1-G37R têm uma alteração na estrutura, comparativamente com o dSOD1, observando-se um aumento significativo da exposição de zonas hidrofóbicas identificativo de um estado não-nativo, do tipo *molten globule*. Esta foi uma observação relevante, visto que muitas proteínas que agregam nas doenças neurodegenerativas são intrinsecamente pouco estruturadas, isto é, não têm uma estrutura terciária estável e/ou estrutura secundária, sob condições fisiológicas [110].

Há um conjunto de estudos que evidenciam que a ligação dos cofatores metálicos à SOD1 na forma dimérica (dSOD1) aumenta a sua estabilidade [33], sendo por isso necessário estudar alterações estruturais e de estabilidade impostas pelo ião zinco e pelo ião cobre, na forma mais instável, o monómero. A ligação do zinco à dSOD1 altera significativamente a sua conformação, diminuindo a dinâmica dos *loops* e estabilizando a conformação quaternária da proteína [90]. Curiosamente, através destes estudos concluiu-se que a ligação do ião zinco ao mSOD1 também provoca alterações estruturais, contudo há uma maior exposição das zonas hidrofóbicas e talvez uma maior dinâmica da proteína, visto que esta está menos compacta e apresenta menos estrutura secundária. Conclui-se também que, ao contrário do dSOD1, a forma monomérica, *wild type* e com mutação associada à ELA apresenta pouca alteração da estabilidade na presença do zinco. As alterações conformacionais causadas pela adição do zinco na estrutura da mSOD1 poderão destabilizar a proteína e promover a agregação, visto que as zonas hidrofóbicas estão mais expostas e poderão ter mais apetência para formar interações proteína-proteína [110]. Para testarmos esta hipótese no futuro irá ser realizado um estudo cinético de agregação da mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R na presença do ião zinco.

Não se observaram alterações conformacionais com a ligação do ião de cobre no mSOD1 *wt* e mSOD1-G37R, contudo observou-se um aumento de estabilidade com a adição do cobre na forma monomérica. Estes estudos de estabilidade contrariam estudos computacionais que afirmam que a ligação dos iões metálicos induzem a estabilidade do monómero [33], visto que não se observa aumento de estabilidade com a ligação dos cofatores metálicos. Contudo a obtenção de resultados diferentes pode ser resultado do estudo de diferentes formas monoméricas, pois a mutação utilizada para mimetizar a forma monomérica pode influenciar a ligação dos cofatores.

Relativamente aos ensaios de agregação da SOD1 conclui-se que a SOD1 agrega, tanto na forma dimérica como na forma monomérica, sob condições fisiológicas. Contudo a cinética de agregação da forma monomérica é mais rápida, com um tempo de *lag phase* mais reduzido, significando que esta forma da proteína poderá estar numa conformação mais apta

para agregar. Curiosamente a propensão para agregar das formas monoméricas, mSOD1 wt e mSOD1-G37R é semelhante nas condições testadas, visto que a forma da cinética de agregação, a velocidade e o tempo de *lag phase* são semelhantes. Com estes resultados deduzimos que a dimerização é um fator importante para a inibição da agregação e que a forma monomérica sem metais poderá ser a conformação mais propensa para agregar.

O fato de existirem diferentes formas da SOD1 sob a forma de agregados, com uma coexistência de forma monomérica e forma dimérica nos mesmos agregados levou ao estudo da influência da mSOD1 na agregação da dSOD1. O *seeding* realizado com pequenas quantidades de mSOD1 na solução da dSOD1 verifica que o mSOD1 acelera a agregação da dSOD1 e indicia que a forma monomérica pode desempenhar um papel de precursor patológico da agregação da SOD1. Este processo pode dever-se ao fato do núcleo hidrofóbico da proteína estar mais exposto sendo mais propenso a adquirir conformações com apetência para agregar.

Sabendo que existem outras proteínas envolvidas em doenças neurodegenerativas cujo papel dos cofatores metálicos na agregação é relevante [3], seria interessante também observar o efeito dos cofatores metálicos na agregação da SOD1, principalmente para observar se o zinco, que induz maior exposição de zonas hidrofóbicas pode potenciar a agregação.

Na segunda parte do trabalho examinou-se o efeito de metabolitos, presentes em concentrações alteradas no fluido cérebroespinal de pacientes com ELA, na estabilidade e agregação da SOD1. Esta é uma vertente muito importante para estudar os mecanismos de agregação da SOD1, visto que o conhecimento dos processos que levam à agregação e os mecanismos que os inibem providenciam possíveis vias para intervenções terapêuticas.

Estes pequenos metabolitos poderão atuar como corretores do *folding* da SOD1. Conclui-se que, apesar de existir uma diminuição da estrutura secundária da proteína, na presença da maioria dos metabolitos, estes apenas têm um efeito destabilizador na forma monomérica, mSOD1^{SH-SH}, mas que esse efeito não se traduz numa alteração da cinética de agregação. Contrariamente, apesar dos metabolitos não influenciarem a estabilidade da dSOD1, induzem uma inibição na sua cinética de agregação. Sugerindo-se que estes metabolitos poderão atuar por dois mecanismos distintos: na forma *wild type* dimérica, dSOD1, os metabolitos poderão influenciar a cinética de agregação e favorecer a forma nativa, inibindo a formação de agregados, mas não alterando a estabilidade desta; contudo na forma mais instável, mSOD1^{SH-SH}, atuam de modo díspar, visto que ao destabilizarem a proteína poderão potenciar a agregação. Este estudo é muito relevante pois poderá providenciar conhecimento sobre mecanismos de inibição da agregação proteica da SOD1 e poderá ser a chave para tratamentos da ELA.

V. BIBLIOGRAFIA

1. Anfinsen, C.B., *Principles that govern the folding of protein chains*. Science, 1973. **181**(4096): p. 223-30.
2. Chiti, F. and C.M. Dobson, *Protein misfolding, functional amyloid, and human disease*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 333-66.
3. Leal, S.S., Botelho, H. M., Gomes, C.M. , *Metal ions as modulators of protein conformation and misfolding in neurodegeneration*. Coordination Chemistry Reviews, 2012.
4. Crowe, J. and T. Bradshaw, *Chemistry for the Biosciences*. Oxford University Press: New York, 2006.
5. Dill, K.A., et al., *The protein folding problem*. Annu Rev Biophys, 2008. **37**: p. 289-316.
6. Gregersen, N., et al., *Protein misfolding and human disease*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2006. **7**: p. 103-24.
7. Bryngelson, J.D., et al., *Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: a synthesis*. Proteins, 1995. **21**(3): p. 167-95.
8. Hartl, F.U. and M. Hayer-Hartl, *Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(6): p. 574-81.
9. Yamashita, M.M., et al., *Where metal ions bind in proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(15): p. 5648-52.
10. Gomes, C.M. and P. Wittung-Stafshede, *Metal ions, Protein Folding and Conformational States - An Introduction*. In *Protein folding and Metal Ions: Mechanisms, Biology and Disease*. CRC Press, USA, 2010.
11. Yon, J.M., *Protein folding: concepts and perspectives*. Cell Mol Life Sci, 1997. **53**(7): p. 557-67.
12. Mahley, R.W. and Y. Huang, *Apolipoprotein (apo) E4 and Alzheimer's disease: unique conformational and biophysical properties of apoE4 can modulate neuropathology*. Acta Neurol Scand Suppl, 2006. **185**: p. 8-14.
13. Uversky, V.N., J. Li, and A.L. Fink, *Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation*. J Biol Chem, 2001. **276**(14): p. 10737-44.
14. Skora, L., S. Becker, and M. Zweckstetter, *Molten globule precursor states are conformationally correlated to amyloid fibrils of human beta-2-microglobulin*. J Am Chem Soc, 2010. **132**(27): p. 9223-5.
15. Wickner, S., et al., *A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(25): p. 12218-22.
16. Ross, C.A. and M.A. Poirier, *Protein aggregation and neurodegenerative disease*. Nat Med, 2004. **10 Suppl**: p. S10-7.
17. Viles, J., *Metal ions and amyloid fiber formation in neurodegenerative diseases. Copper, zinc and iron in Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases*. Coordination Chemistry Reviews, 2012. **256**: p. 2271– 2284.
18. Cohen, S.I., et al., *From macroscopic measurements to microscopic mechanisms of protein aggregation*. J Mol Biol, 2012. **421**(2-3): p. 160-71.
19. Munoz, V., *Protein folding, misfolding and aggregation*. Royal Society of Chemistry 2008.
20. Leandro, P. and C.M. Gomes, *Protein misfolding in conformational disorders: rescue of folding defects and chemical chaperoning*. Mini Rev Med Chem, 2008. **8**(9): p. 901-11.
21. Welch, W.J. and C.R. Brown, *Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding*. Cell Stress Chaperones, 1996. **1**(2): p. 109-15.
22. Singh, L.R., et al., *Protein and DNA destabilization by osmolytes: the other side of the coin*. Life Sci, 2011. **88**(3-4): p. 117-25.
23. Xie, G. and S.N. Timasheff, *Temperature dependence of the preferential interactions of ribonuclease A in aqueous co-solvent systems: thermodynamic analysis*. Protein Sci, 1997. **6**(1): p. 222-32.
24. Kaushik, J.K. and R. Bhat, *Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose*. J Biol Chem, 2003. **278**(29): p. 26458-65.
25. Kuhn, L.A., et al., *Atomic and residue hydrophilicity in the context of folded protein structures*. Proteins, 1995. **23**(4): p. 536-47.

26. Poddar, N.K., et al., *Effect of monomeric and oligomeric sugar osmolytes on DeltaGD, the Gibbs energy of stabilization of the protein at different pH values: is the sum effect of monosaccharide individually additive in a mixture?* Biophys Chem, 2008. **138**(3): p. 120-9.
27. Arakawa, T., et al., *Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs.* Biochim Biophys Acta, 2006. **1764**(11): p. 1677-87.
28. Chattopadhyay, M. and J.S. Valentine, *Aggregation of copper-zinc superoxide dismutase in familial and sporadic ALS.* Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(7): p. 1603-14.
29. Valentine, J.S., P.A. Doucette, and S. Zittin Potter, *Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis.* Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 563-93.
30. Lindenau, J., et al., *Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS.* Glia, 2000. **29**(1): p. 25-34.
31. Reaume, A.G., et al., *Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury.* Nat Genet, 1996. **13**(1): p. 43-7.
32. Coussee, E., et al., *G37R SOD1 mutant alters mitochondrial complex I activity, Ca(2+) uptake and ATP production.* Cell Calcium, 2011. **49**(4): p. 217-25.
33. Ding, F. and N.V. Dokholyan, *Dynamical roles of metal ions and the disulfide bond in Cu, Zn superoxide dismutase folding and aggregation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(50): p. 19696-701.
34. Lang, L., et al., *Fibrillation precursor of superoxide dismutase 1 revealed by gradual tuning of the protein-folding equilibrium.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012.
35. Grad, L.I., et al., *Intermolecular transmission of superoxide dismutase 1 misfolding in living cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(39): p. 16398-403.
36. Bruijn, L.I., et al., *Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1.* Science, 1998. **281**(5384): p. 1851-4.
37. Nordlund, A., et al., *Functional features cause misfolding of the ALS-provoking enzyme SOD1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(24): p. 9667-72.
38. Furukawa, Y. and T.V. O'Halloran, *Posttranslational modifications in Cu,Zn-superoxide dismutase and mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis.* Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(5-6): p. 847-67.
39. Roe, J.A., et al., *Differential scanning calorimetry of Cu,Zn-superoxide dismutase, the apoprotein, and its zinc-substituted derivatives.* Biochemistry, 1988. **27**(3): p. 950-8.
40. Banci, L., et al., *Metal-free superoxide dismutase forms soluble oligomers under physiological conditions: a possible general mechanism for familial ALS.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(27): p. 11263-7.
41. Chattopadhyay, M., et al., *Initiation and elongation in fibrillation of ALS-linked superoxide dismutase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(48): p. 18663-8.
42. Kayatekin, C., J.A. Zitzewitz, and C.R. Matthews, *Zinc binding modulates the entire folding free energy surface of human Cu,Zn superoxide dismutase.* J Mol Biol, 2008. **384**(2): p. 540-55.
43. Arnesano, F., et al., *The unusually stable quaternary structure of human Cu,Zn-superoxide dismutase 1 is controlled by both metal occupancy and disulfide status.* J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 47998-8003.
44. Banci, L., et al., *Solution structure of Apo Cu,Zn superoxide dismutase: role of metal ions in protein folding.* Biochemistry, 2003. **42**(32): p. 9543-53.
45. Prohaska, J.R., et al., *Copper, zinc-superoxide dismutase protein but not mRNA is lower in copper-deficient mice and mice lacking the copper chaperone for superoxide dismutase.* Exp Biol Med (Maywood), 2003. **228**(8): p. 959-66.
46. Gralla, E.B., et al., *ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(19): p. 8558-62.
47. Culotta, V.C., et al., *A physiological role for Saccharomyces cerevisiae copper/zinc superoxide dismutase in copper buffering.* J Biol Chem, 1995. **270**(50): p. 29991-7.
48. O'Halloran, T.V. and V.C. Culotta, *Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions.* J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25057-60.
49. Lamb, A.L., et al., *Heterodimer formation between superoxide dismutase and its copper chaperone.* Biochemistry, 2000. **39**(48): p. 14720-7.
50. Furukawa, Y., A.S. Torres, and T.V. O'Halloran, *Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS.* EMBO J, 2004. **23**(14): p. 2872-81.

51. Nagano, S., et al., *Benefit of a combined treatment with trientine and ascorbate in familial amyotrophic lateral sclerosis model mice*. Neurosci Lett, 1999. **265**(3): p. 159-62.
52. Hottinger, A.F., et al., *The copper chelator d-penicillamine delays onset of disease and extends survival in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis*. Eur J Neurosci, 1997. **9**(7): p. 1548-51.
53. Lindberg, M.J., et al., *Folding of human superoxide dismutase: disulfide reduction prevents dimerization and produces marginally stable monomers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(45): p. 15893-8.
54. Lindberg, M.J., et al., *Systematically perturbed folding patterns of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-associated SOD1 mutants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(28): p. 9754-9.
55. Stathopoulos, P.B., et al., *Cu/Zn superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis show enhanced formation of aggregates in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(12): p. 7021-6.
56. http://faculty.chemistry.ucla.edu/institution/personnel?personnel_id=45689. acessado a 20/9/2012.
57. Hart, P.J., et al., *Subunit asymmetry in the three-dimensional structure of a human CuZnSOD mutant found in familial amyotrophic lateral sclerosis*. Protein Sci, 1998. **7**(3): p. 545-55.
58. Banci, L., et al., *Metalation of the amyotrophic lateral sclerosis mutant glycine 37 to arginine superoxide dismutase (SOD1) apoprotein restores its structural and dynamical properties in solution to those of metalated wild-type SOD1*. Biochemistry, 2007. **46**(35): p. 9953-62.
59. Rakhit, R., et al., *An immunological epitope selective for pathological monomer-misfolded SOD1 in ALS*. Nat Med, 2007. **13**(6): p. 754-9.
60. Bruns, C.K. and R.R. Kopito, *Impaired post-translational folding of familial ALS-linked Cu, Zn superoxide dismutase mutants*. EMBO J, 2007. **26**(3): p. 855-66.
61. Liu, H.N., et al., *Targeting of Monomer/Misfolded SOD1 as a Therapeutic Strategy for Amyotrophic Lateral Sclerosis*. J Neurosci, 2012. **32**(26): p. 8791-9.
62. Johansson, A.S., et al., *Cytotoxicity of superoxide dismutase 1 in cultured cells is linked to Zn²⁺ chelation*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e36104.
63. Ding, F., et al., *Local unfolding of cu, zn superoxide dismutase monomer determines the morphology of fibrillar aggregates*. J Mol Biol, 2012. **421**(4-5): p. 548-60.
64. Bertini, I., et al., *A spectroscopic characterization of a monomeric analog of copper, zinc superoxide dismutase*. Eur Biophys J, 1994. **23**(3): p. 167-76.
65. Rakhit, R., et al., *Monomeric Cu,Zn-superoxide dismutase is a common misfolding intermediate in the oxidation models of sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 15499-504.
66. Rozen, S., et al., *Metabolomic analysis and signatures in motor neuron disease*. Metabolomics, 2005. **1**(2): p. 101-108.
67. Tanaka, M., et al., *Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease*. Nat Med, 2004. **10**(2): p. 148-54.
68. Niessen, H.G., et al., *Metabolic progression markers of neurodegeneration in the transgenic G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*. Eur J Neurosci, 2007. **25**(6): p. 1669-77.
69. Wuolikainen, A., et al., *ALS patients with mutations in the SOD1 gene have an unique metabolomic profile in the cerebrospinal fluid compared with ALS patients without mutations*. Mol Genet Metab, 2012. **105**(3): p. 472-8.
70. Perry, T.L., et al., *Amyotrophic lateral sclerosis: amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid*. Ann Neurol, 1990. **28**(1): p. 12-7.
71. Camu, W., M. Billiard, and M. Baldy-Moulinier, *Fasting plasma and CSF amino acid levels in amyotrophic lateral sclerosis: a subtype analysis*. Acta Neurol Scand, 1993. **88**(1): p. 51-5.
72. Greenfield, N.J., *Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2876-90.
73. Kelly, S.M., T.J. Jess, and N.C. Price, *How to study proteins by circular dichroism*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1751**(2): p. 119-39.
74. Shirley, B.A., *Methods in Molecular Biology - Protein Stability and Folding: Theory and practice*. Human Press Inc., 1995. **40**.

75. Munishkina, L.A. and A.L. Fink, *Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(8): p. 1862-85.
76. Hawe, A., M. Sutter, and W. Jiskoot, *Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization*. Pharm Res, 2008. **25**(7): p. 1487-99.
77. Niesen, F.H., H. Berglund, and M. Vedadi, *The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability*. Nat Protoc, 2007. **2**(9): p. 2212-21.
78. Ericsson, U.B., et al., *Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies*. Anal Biochem, 2006. **357**(2): p. 289-98.
79. Fabian, H. and D. Naumann, *Methods to study protein folding by stopped-flow FT-IR*. Methods, 2004. **34**(1): p. 28-40.
80. Balakrishnan, G., et al., *Protein dynamics from time resolved UV Raman spectroscopy*. Curr Opin Struct Biol, 2008. **18**(5): p. 623-9.
81. Biswas, R., et al., *Use of EPR spectroscopy to study macromolecular structure and function*. Sci Prog, 2001. **84**(Pt 1): p. 45-67.
82. Dyson, H.J. and P.E. Wright, *Elucidation of the protein folding landscape by NMR*. Methods Enzymol, 2005. **394**: p. 299-321.
83. Morris, A.M., M.A. Watzky, and R.G. Finke, *Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: a review of the literature*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1794**(3): p. 375-97.
84. Kaye, R. and C.G. Glabe, *Conformation-dependent anti-amyloid oligomer antibodies*. Methods Enzymol, 2006. **413**: p. 326-44.
85. Kaye, R., et al., *Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers*. Mol Neurodegener, 2007. **2**: p. 18.
86. Ahl, I.M., Lindberg, M. J., and Tibell, L. A., *Protein expression and purification*. 2004. **37**: p. 311-319.
87. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
88. Sabel, C.E., J.M. Neureuther, and S. Siemann, *A spectrophotometric method for the determination of zinc, copper, and cobalt ions in metalloproteins using Zincon*. Anal Biochem, 2010. **397**(2): p. 218-26.
89. McCord, J.M. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)*. J Biol Chem, 1969. **244**(22): p. 6049-55.
90. Potter, S.Z., et al., *Binding of a single zinc ion to one subunit of copper-zinc superoxide dismutase apoprotein substantially influences the structure and stability of the entire homodimeric protein*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(15): p. 4575-83.
91. Sarell, C.J., S.R. Wilkinson, and J.H. Viles, *Substoichiometric levels of Cu²⁺ ions accelerate the kinetics of fiber formation and promote cell toxicity of amyloid- β from Alzheimer disease*. J Biol Chem, 2010. **285**(53): p. 41533-40.
92. Ahl, I.M., M.J. Lindberg, and L.A. Tibell, *Coexpression of yeast copper chaperone (yCCS) and CuZn-superoxide dismutases in Escherichia coli yields protein with high copper contents*. Protein Expr Purif, 2004. **37**(2): p. 311-9.
93. Banci, L., et al., *Synthesis and characterization of a monomeric mutant Cu/Zn superoxide dismutase with partially reconstituted enzymic activity*. Eur J Biochem, 1995. **234**(3): p. 855-60.
94. Svensson, A.K., et al., *Mapping the folding free energy surface for metal-free human Cu,Zn superoxide dismutase*. J Mol Biol, 2006. **364**(5): p. 1084-102.
95. Munch, C. and A. Bertolotti, *Exposure of hydrophobic surfaces initiates aggregation of diverse ALS-causing superoxide dismutase-1 mutants*. J Mol Biol, 2010. **399**(3): p. 512-25.
96. Yutani, K., K. Ogasahara, and K. Kuwajima, *Absence of the thermal transition in apo-alpha-lactalbumin in the molten globule state. A study by differential scanning microcalorimetry*. J Mol Biol, 1992. **228**(2): p. 347-50.
97. Furukawa, Y. and T.V. O'Halloran, *Amyotrophic lateral sclerosis mutations have the greatest destabilizing effect on the apo- and reduced form of SOD1, leading to unfolding and oxidative aggregation*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 17266-74.
98. Doucette, P.A., et al., *Dissociation of human copper-zinc superoxide dismutase dimers using chaotrope and reductant. Insights into the molecular basis for dimer stability*. J Biol Chem, 2004. **279**(52): p. 54558-66.

99. Khare, S.D., M. Caplow, and N.V. Dokholyan, *The rate and equilibrium constants for a multistep reaction sequence for the aggregation of superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(42): p. 15094-9.
100. Fink, A.L., *Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid*. Fold Des, 1998. **3**(1): p. R9-23.
101. Dobson, C.M., *Protein misfolding, evolution and disease*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(9): p. 329-32.
102. Groenning, M., *Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status*. J Chem Biol, 2010. **3**(1): p. 1-18.
103. Zetterstrom, P., et al., *Soluble misfolded subfractions of mutant superoxide dismutase-1s are enriched in spinal cords throughout life in murine ALS models*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(35): p. 14157-62.
104. Wuolikainen, A., et al., *Disease-related changes in the cerebrospinal fluid metabolome in amyotrophic lateral sclerosis detected by GC/TOFMS*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e17947.
105. Klunk, W.E., et al., *Aggregation of beta-amyloid peptide is promoted by membrane phospholipid metabolites elevated in Alzheimer's disease brain*. J Neurochem, 1997. **69**(1): p. 266-72.
106. Burke, W.J., et al., *Neurotoxicity of MAO metabolites of catecholamine neurotransmitters: role in neurodegenerative diseases*. Neurotoxicology, 2004. **25**(1-2): p. 101-15.
107. Wishart, D.S., et al., *HMDB: the Human Metabolome Database*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(Database issue): p. D521-6.
108. Matulis, D., et al., *1-anilino-8-naphthalene sulfonate as a protein conformational tightening agent*. Biopolymers, 1999. **49**(6): p. 451-8.
109. Teilum, K., et al., *Transient structural distortion of metal-free Cu/Zn superoxide dismutase triggers aberrant oligomerization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(43): p. 18273-8.
110. Breydo, L. and V.N. Uversky, *Role of metal ions in aggregation of intrinsically disordered proteins in neurodegenerative diseases*. Metallomics, 2011. **3**(11): p. 1163-80.

VI. ANEXOS

ANEXO I

Meio TB

Para 1L: 12g triptona (*Fluka*); 24g extrato de levedura (*Biokan*); 9,4g Mono-Hidrogenofosfato de Potássio (*Merck*); 2,2g Di-Hidrogenofosfato de Potássio (*Merck*); 4mL glicerol 87% (*Merck*).

Meio LA

Para 1L: 10g triptona (*Fluka*); 5g extrato de levedura (*Biokan*); 5g NaCl (*Panreac*); 15g Agar (*Roth*).

ANEXO II

Soluções tampão utilizadas nos géis SDS-PAGE

Tampão de amostra:

0,125M Tris (*Sigma-Aldrich*); 6% (m/v) SDS (*Roth*); 20% (v/v) glicerol (*Merck*); 5% (v/v) β-mercaptoetanol (*Sigma-Aldrich*); 0,02% (m/v) azul de bromofenol (*Sigma-Aldrich*), pH 6,8.

Tampão de eluição (5x)

Após diluição 1:5: 0,025M Tris (*Sigma-Aldrich*); 0,192M glicina (*Sigma-Aldrich*); 4% SDS (*Roth*), pH 8,3.

Soluções tampão utilizadas nos géis Native-PAGE

Tampão de amostra:

0,125M Tris (*Sigma-Aldrich*); 20% (v/v) glicerol (*Merck*); 5% (v/v) β-mercaptoetanol (*Sigma-Aldrich*); 0,02% (m/v) azul de bromofenol (*Sigma-Aldrich*), pH 6,8.

Tampão de eluição (5x)

Após diluição 1:5: 0,025M Tris (*Sigma-Aldrich*); 0,192M glicina (*Sigma-Aldrich*), pH 8,3.

Composição dos géis SDS-PAGE 12%

Gel resolvente 12%	Volume (μL)
Água	1750
Tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8 com 0,3% SDS	1250
30% Acrilamida	2000
Tetrametiletilenodiamina (TEMED)	5
10% Persulfato de amónio (PSA)	25
Gel concentrador 4%	
Água	1153
Tampão Tris-HCl 0,5M pH 6,8 com 0,4% SDS	625
30% Acrilamida	325
Tetrametiletilenodiamina (TEMED)	2.5
10% Persulfato de amónio (PSA)	12.5

Composição dos géis Nativo-PAGE 12%

Gel resolvente 12%	Volume (μL)
Água	1750
Tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8	1250
30% Acrilamida	2000
Tetrametiletilenodiamina (TEMED)	5
10% Persulfato de amónio (PSA)	25
Gel concentrador 4%	
Água	1153
Tampão Tris-HCl 0,5M pH 6,8	625
30% Acrilamida	325
Tetrametiletilenodiamina (TEMED)	2.5
10% Persulfato de amónio (PSA)	12.5

ANEXO III

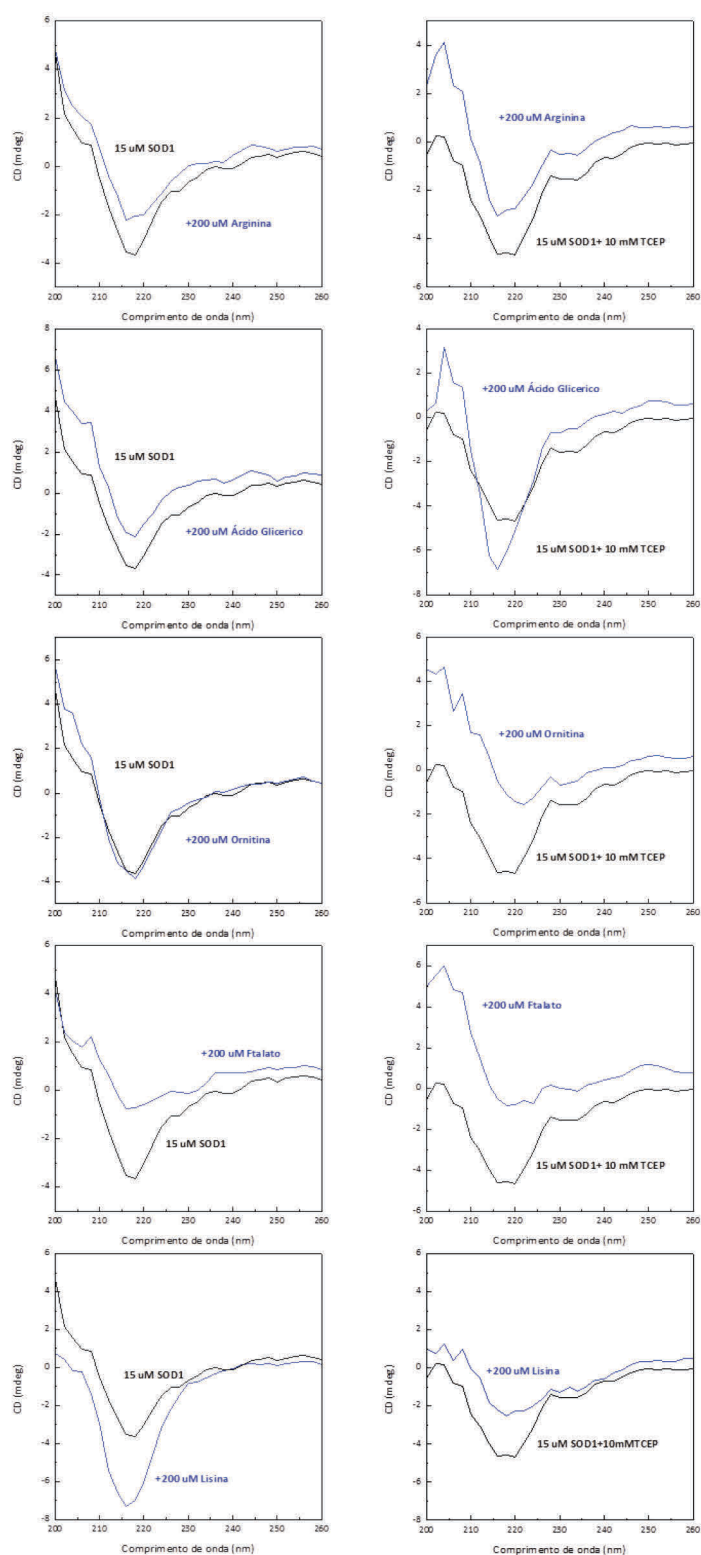


Figura 6.1: Espectros de CD da SOD1 na presença e na ausência de 5 metabolitos com uma concentração de 200μM (Arginina, Ácido glicérico, Ornitina, Ftalato e Lisina). Os espectros do lado esquerdo correspondem à dSOD1 e os espectros do lado direito correspondem à mSOD1^{SH-SH}.

ANEXO IV

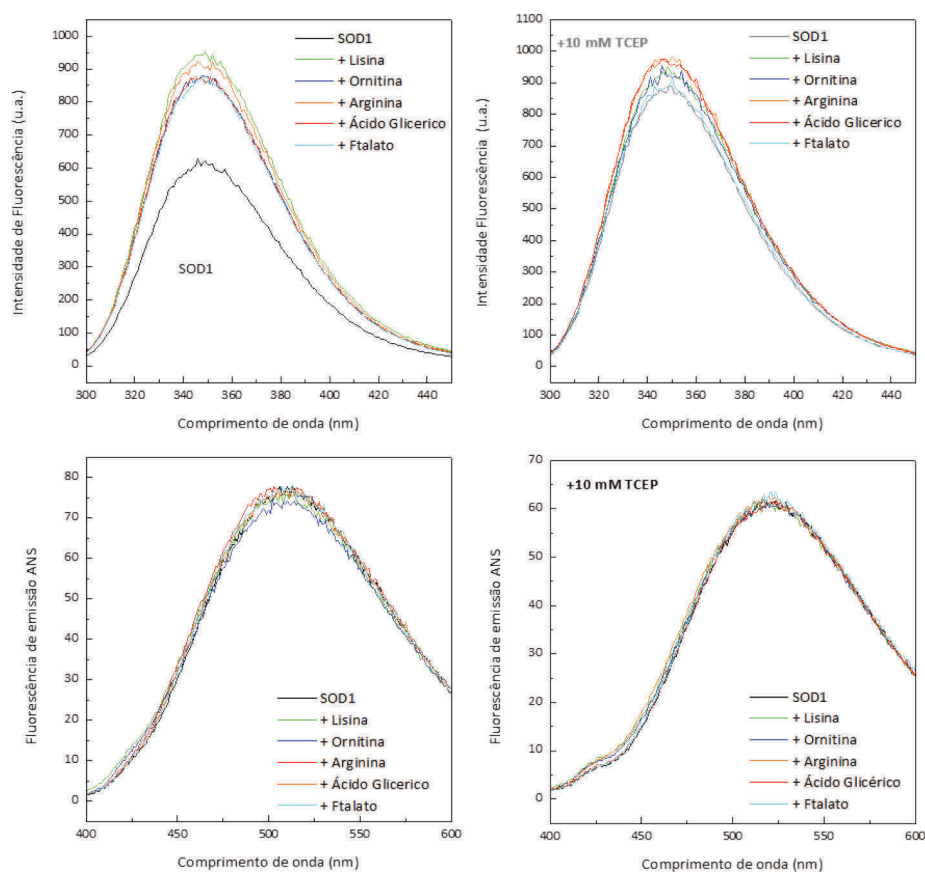


Figura 6.2: Espectros de fluorescência de emissão de triptofano e de emissão do ANS da SOD1, na presença e na ausência de 5 metabólitos (Arginina, ácido glicérico, ornitina, Ftalato e Lisina), com uma concentração de 200 μ M. Os espectros do lado esquerdo correspondem à dSOD1 e os espectros do lado direito correspondem à mSOD1^{SH-SH}.

ANEXO V

Tabela 6.1: Análise das Intensidades dos *dot blots* com o anticorpo Anti A11 (Anti-oligómeros) e com o anti-corpo OC (anti-fibras). Calculadas com o programa *Quantity One* (BioRad).

	SOD1	+Lisina	+Ftalato	+Ornitina	+Arginina	+Ácido Glicérico
Anti - A11	100%	97%	74%	109%	120%	107%
Anti - OC	100%	93%	87%	81%	112%	95%

